WIRKUNGEN VON KÄLBER - MILZEXTRAKTEN AUF DAS WEISSE BLUTBILD DER MAUS

Gerda Rindfleisch

1972

Druck- und Verlagsanstalt

Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuss-Platz 3 · Telefon (0821) 25563

Printed in Germany

Aus dem Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
Assoziation mit Euratom, München
(Leiter:Prof.Dr.W.Stich)
und der I.Medizinischen Klinik der Universität München
Abteilung für Hämatologie
(Vorstand: Prof.Dr.W.Stich)

WIRKUNGEN VON KÄLBER - MILZEXTRAKTEN AUF DAS WEISSE BLUTBILD DER MAUS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians - Universität zu München
vorgelegt von

Gerda Rindfleisch
aus Göttingen
1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Stich
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 11. 1972

Für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof.Dr.med.W. S t i c h danken.

Herrn Dr.med.M.S c h m i d t sei für seine tatkräftige Hilfe und die anregenden Diskussionen im Verlauf der Arbeit und auch für seine anschließende Geduld herzlicher Dank gesagt.

Ferner möchte ich Herrn Dr.med.R.L a m e r z und besonders Herrn Dr.med.KH.R.K o c z o r e k für ihre Unterstützung in allen statistischen Fragen danken.

Und schließlich möchte ich noch allen denen Dank sagen, die mir durch manchen Rat und Zuspruch die Durchführung dieser Arbeit nicht unwesentlich erleichtert haben.

Seite

A.	E I N L E I T U N G	1
A.1.	G e s i c h e r t e F u n k t i o n e n d e r M i l z	1
A.2.	W a h r s c h e i n l i c h e F u n k t i o n e n d e r M i l z	1
A.3.	H y p o t h e t i s c h e F u n k t i o n e n d e r M i l z	3
A.4.	B e g r ü n d u n g u n d F o r m u l i e r u n g u n s e r e r A u f g a b e	4
A.4.1.	Hinweise auf die Existenz sogenannter Milzfaktoren	5
A.4.2.	Eigenes Vorgehen	8
B.	M E T H O D I K	9
B.1.	T i e r e	9
B.1.1.	Intakte Mäuse	9
B.1.2.	Mäuse mit Lymphatischer Leukämie	9
B.1.2.a.	Chronisch lymphatische Leukämien	9
B.1.2.b.	Akute lymphatische Leukämien	9
B.1.3.	Ratten	10
B.1.4.	Haltung der Tiere	10
B.2.	V e r s u c h e m i t M e t h y l c e l l u l o s e z u r E r z e u g u n g v o n h y p e r s p l e n e n T i e r m i l z e n	11
B.2.1.	Ratten	11
B.2.2.	Mäuse	11
B.2.3.	Auswertung	11

		Seite
B.3.	Herstellung verschiedener Organextrakte	12
B.3.1.	Organe	12
B.3.2.	Einfacher Milzextrakt (Mex)	12
B.3.3.	Leber- und Lungenextrakt	13
B.3.4.	Erhitzter Milzextrakt (80°)	13
B.3.5.	Herstellung von Extrakten unter Verwendung organischer Lösungsmittel	13
B.3.5.a.	Methanolextrakt I (OH I)	14
B.3.5.b.	Methanolextrakt II (OH II)	14
B.3.5.c.	Chloroform-Elution ($CHCl_3$)	14
B.3.6.	Herstellung von Extrakten unter veränderten Dialysebedingungen	15
B.3.6.a.	Dialyse mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	15
B.3.6.b.	Konzentrierte Dialyse (Ko)	15
B.4.	Säulenchromatographie	15
B.4.1.	Reinigung der Extrakte	15
B.4.2.	Auftrennung der Extrakte	16
B.5.	Tierversuche	17
B.5.1.	Injektion und Dosierung der Extrakte	17
B.5.2.	Blutentnahme und Auswertung	17
B.6.	Statistische Auswertung	18
C.	ERGEBNISSE	20
C.1.	Hypersplenie-Versuche mit Methylcellulose	20
C.1.1.	Ratten	20

Seite

C.1.2. Mäuse 21

C.2. Einfacher Milzextrakt 22

C.2.1.a. Verhalten der Leukocyten nach Milzextrakt 23

C.2.1.b. Verhalten der Leukocyten nach Kochsalzlösung 23

C.2.1.c. Vergleich der Leukocyten nach Milzextrakt und nach Kochsalzlösung 23

C.2.2.a. Verhalten der Granulocyten nach Milzextrakt 26

C.2.2.b. Verhalten der Granulocyten nach Kochsalzlösung 26

C.2.2.c. Vergleich der Granulocyten nach Milzextrakt und nach Kochsalzlösung 26

C.2.3. Kernverschiebungs-Index 29

C.2.3.a. Verhalten des Kernverschiebungs-Index nach Milzextrakt 29

C.2.3.b. Verhalten des Kernverschiebungs-Index nach Kochsalzlösung 30

C.2.4.a. Verhalten der Lymphocyten nach Milzextrakt 32

C.2.4.b. Verhalten der Lymphocyten nach Kochsalzlösung 32

C.2.4.c. Vergleich der Lymphocyten nach Milzextrakt und nach Kochsalzlösung 32

C.2.5. Lymphocyten-Index 35

C.2.5.a. Verhalten des Lymphocyten-Index nach Milzextrakt 35

C.2.5.b. Verhalten des Lymphocyten-Index nach Kochsalzlösung 35

Seite

C.2.6.a. Verhalten der eosinophilen Granulocyten nach Milzextrakt 37

C.2.6.b. Verhalten der eosinophilen Granulocyten nach Kochsalzlösung 38

C.2.7.a. Verhalten der Monocyten nach Milzextrakt 40

C.2.7.b. Verhalten der Monocyten nach Kochsalzlösung 40

C.3. Prüfung von Extrakten nach vier Stunden 42

C.3.1.a. Methanolextrakt I 42

C.3.1.b. Methanolextrakt II 42

C.3.2. Konzentrierte Dialyse 43

C.3.3. Methylcellulose-Rattenmilzextrakt 43

C.3.4. Leberextrakt 44

C.4. Prüfung von Extrakten nach 24 Stunden 44

C.4.1. Erhitzter Milzextrakt 44

C.4.2. Chloroform-Elution 46

C.4.3. Saure Dialyse 46

C.4.4. Extrakte aus Rattenmilz und Methylcellulose-Rattenmilz 46

C.5. Fraktionierte Extrakte 48

C.5.1. Trennung in drei Fraktionen 48

C.5.1.a. Veränderungen nach Fraktion I, II und III nach acht Stunden 48

C.5.1.b. Veränderungen nach Fraktion I, II und III nach 24 Stunden 48

Seite

C.5.2. Trennung in vier Fraktionen 49

C.5.2.a. Wirkungsgleichheit 49

C.5.2.b. Wirkungsunterschiede 49

C.6. Untersuchungen bei chronisch lymphatischer Leukämie. 55

C.6.1. Altersabhängigkeit der Blutbilder 55

C.6.2. Versuche mit Milzextrakt 55

C.6.2.a. Vergleich unbehandelter Tiere mit Milzextrakt-behandelten nach 10 Tagen und vier Wochen 56

C.6.2.b. Vergleich unbehandelter Tiere mit Kochsalz-behandelten nach 10 Tagen und vier Wochen 56

C.6.2.c. Vergleich der ersten Kontrolle nach 10 Tagen mit der zweiten nach 4 Wochen 57

C.6.2.d. Vergleich zwischen Milzextrakt- und Kochsalz-Behandlung 57

C.7. Untersuchungen bei akuter lymphatischer Leukämie 59

C.7.1. Überlebenszeiten 59

C.7.2. Blutbilder 60

Seite

D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 63

E. ZUSAMMENFASSUNG 76

F. TABELLARISCHER ANHANG
(Absolute Häufigkeiten mit Verteilungen
und statistischen Kennzahlen) 79

G. LITERATURVERZEICHNIS 126

H. LEBENSLAUF 136

A. E I N L E I T U N G

Die Angaben in der Literatur über verschiedene Funktionen der Milz im menschlichen Organismus lassen sich annähernd in der nachstehenden Weise gruppieren:

A.1. G e s i c h e r t e F u n k t i o n e n

Heute gelten die folgenden Funktionen der menschlichen Milz im hämatologischen Geschehen als gesichert (37,56,81):

1 - die fetale Erythropoese
2 - die Lymphopoese
3 - unter besonderen Bedingungen eine extramedulläre Blutbildung
4 - die Zerstörung von normalen, geschädigten und/oder atypischen Erythrocyten
5 - die Eliminierung von Kernresten (Howell-Jolly-Bodies), Siderin, Innenkörpern o.ä. aus Erythrocyten
6 - Phagocytose
7 - Antikörperproduktion

A.2. W a h r s c h e i n l i c h e F u n k t i o n e n

Zahlreiche Beobachtungen über eine Beteiligung an verschiedenen, nicht im eigentlichen Sinne hämatologischen Vorgängen geben Hinweise auf eine humo-

rale Aktivität der Milz.

- So beobachteten z.B. TÜNNERHOFF und SCHWABE (72) beim Meerschweinchen eine beschleunigte Ausbildung typischen Granulationsgewebes nach Milzextraktgabe.
- RIGLER und ROSENKRANZ (59) untersuchten mesenchymale Zellteilungsvorgänge am Deziduom der Ratte. Die durch Splenektomie hervorgerufenen Veränderungen konnten dabei durch Milzextrakte unterschiedlicher Herstellung und Provenienz wieder aufgehoben werden.
- ARAKI (7) berichtete über eine carcinostatische Aktivität von Rindermilzextrakten an Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen bei Mäusen.
- OLITZKI (53) gewann aus Mäusemilzen eine Substanz, die Versuchstiere vor tödlichen Infektionen mit Salmonella typhi zu schützen vermochte.
- Die Arbeitsgruppe um KAISER (2o,42-46,6o-62) zeigte, daß die Milz an endokrinen Regulationsvorgängen im Zusammenspiel mit der Nebennierenrinde partizipiert.
- UNGAR (73) fand einen Einfluß der Milz auf das Verhalten der Blutungszeit unter Stress.
- Nach REIN (58) verbesserte sich die Myocardleistung unter akuter Hypoxie beim Hund durch Zufuhr geringer Mengen von Milzvenenblut. Bei

überkritischer Coronar-Arterien-Drosselung waren nicht hämodynamische Funktionen der Milz, sondern im Milzvenenblut respektive -plasma vorhandene Substanzen für das Überleben der Versuchstiere verantwortlich.

- THORP (70) und COBBIN und THORP (13) isolierten aus Ochsenmilzen eine in ihrer Wirksamkeit dem Digitalis ähnliche Substanz, die in den Calcium-Transport eingreift.

Für die Stoffe, die alle diese Aktivitäten entwickeln, wurden Namen gefunden wie "Splenitransin" (70), "Splenocytin"(53), "Splenin" (73) etc.

A.3. H y p o t h e t i s c h e F u n k t i o n e n

Für eine möglicherweise inkretorische Funktion der Milz mit Zielrichtung auf das hämatopoetische System sprechen klinische und experimentelle Befunde. Jedoch ist die Meinung darüber nicht einhellig, da eine histologische Bestätigung bislang noch aussteht.

Die ersten Vermutungen in dieser Richtung äußerte im Jahre 1883 BANTI (8). Er betrachtete die Milz als Produktionsstätte leukopenisierender Substanzen.

ISAAC (38) postulierte 1912 eine endokrine Funktion der Milz. FRANK (28) entwickelte 1916 die Vorstellung von einer allgemeinen humoralen Wirkung der Milz auf das Knochenmark, und SCHLIEPHAKE (66) betrachtete die Milz als ausgleichendes Organ in einem umfassenden vegetativ-nervös-humoralen Regulationssystem.

BOCK und FRENZEL (12) glaubten 1938 den experimentellen Beweis für eine humoral vermittelte HemmWirkung der Milz auf das Knochenmark erbracht zu haben. Ihre Befunde konnten jedoch von anderen Untersuchern nicht in vollem Umfang bestätigt werden (74).

Die verschiedenen Erkenntnisse auf diesem Gebiet faßte schließlich vor über zwanzig Jahren DAMESHEK (19) zusammen und formulierte seine Theorie des Hypersplenismus, die die sogenannte splenogene Markhemmung durch eine ins Pathologische gesteigerte normale Milzfunktion zu erklären versucht. Dabei werden der Milz überwiegend inhibitorische, humoral vermittelte Effekte auf das Knochenmark zugesprochen.

A.4. Begründung und Formulierung unserer Aufgabe

Auch wenn wir heute mit Hilfe von immunologischen und nuklearmedizinischen Methoden in der Lage sind, die Rolle der Milz bei der Regulation des peri-

pheren Blutbildes weitgehend durch Filterwirkung und Phagocytosetätigkeit zu erklären, gibt es dennoch eine ganze Reihe von Beobachtungen, die sich nicht zwanglos in diese Vorstellung von der Milz einfügen lassen.

A.4.1. Hinweise auf die Existenz sogenannter Milzfaktoren

- Bei Patienten mit Pancytopenien (25), Myelofibrose-Syndrom (76) oder Markaplasien ohne Nachweis spezifischer Antikörper (49,50) normalisierten sich nach Splenektomie die Befunde im Knochenmark und im peripheren Blutbild.
- Im Knochenmark von Ratten nahm nach Splenektomie die Zahl der Megakaryocyten zu, bei Ratten mit Splenomegalie war sie verringert (16).
- Bei Meerschweinchen stieg unmittelbar nach Splenektomie die Zahl der aus dem Thymus entlassenen Lymphocyten an (24).
- Die bei Splenektomie übliche postoperative Erhöhung der Zellzahlen im peripheren Blut ließ sich bei Ratten dadurch verhindern, daß 10% des Milzgewebes im Organismus belassen wurden, oder daß postoperativ Milzextrakte gegeben wurden (54).
- Besondere Beachtung müssen in diesem Zusammenhang die Resultate von TARNUZI (69) finden, der den gleichen Effekt mit Milz-Reimplantaten in

sogenannten "milli-pore-chambers" erzielte. Da solche Kammern für Zellen nicht durchgängig sind, konnte die Milzwirkung in diesem Fall nur humoral vermittelt werden.

- Die Überlebenszeit von Laboratoriumstieren nach Letalbestrahlung wurden von zellfreien Milzextrakten durch raschere Reparation der strahlenbedingten Läsionen im hämopoetischen System verlängert (23,27). Zu ähnlichen Ergebnissen kam ALLEN (6) nach Injektion von Serum aus Milzvenenblut.

- Auch die Leukämierate nach Bestrahlung von Mäusen ließ sich durch Anwendung zellfreier Milzextrakte senken (9,10).

- Aus pathologischen und normalen Milzen gewonnene Extrakte führten zu einer Anämie, Leukopenie und Thrombopenie (15,71) und verhinderten das Auftreten von großen mononukleären Zellen nach Splenektomie (63).

- Eine Reifungshemmung der myeloischen Zellen durch einen Extrakt aus aktivierten Kälbermilzen (39,40) wies v.ALBERT in Knochenmarkkulturen nach (1-5).

- Andererseits isolierten GOSTOMZYK und Mitarbeiter aus Rattenmilzen ein Peptid, das die Ausschüttung membranunreifer Granulocyten aus dem

Knochenmark förderte (31,32).

- WOLF und GERLICH (79,80) setzten einen die Granulopoese fördernden Milzwirkstoff bei toxischen Leukopenien ein. Sie erreichten damit innerhalb weniger Wochen und deutlich rascher als bei unbehandelten Patienten eine vollständige Erholung des Knochenmarks.
- Teil- und Vollremissionen bei akuten Leukämien, chronisch myeloischen Leukämien und terminalen Myeloblastenschüben erzielten dieselben Autoren mit einem anderen Milzextrakt. WOLF und GERLICH wendeten Extrakte aus menschlichen und tierischen Hypersplenie-Milzen an, später auch Extrakte aus normalen Kälbermilzen. Remissionen wurden sogar bei oraler Gabe von roher Milz beobachtet, allerdings mit unregelmäßigem Erfolg.
- Schließlich führt auch bei gesunden Ratten die Verfütterung von roher Milz zu einer Pancytopenie (17).

Alle diese Befunde sind nicht allein durch vermehrte Sequestration und Zerstörung von Zellen in der Milz zu erklären, wie verschiedentlich behauptet wird. Wir können uns daher der Auffassung von WEINREICH (74) und FISCHER (26), es gäbe keine Hinweise für die Bildung von hämatopoetischen und/oder -inhibitorischen Substanzen in der Milz, nicht anschließen.

Vielmehr müssen wir das Beibehalten der Hypothese von der endokrinen oder humoralen Wirkung der Milz auf Hämopoese, Ausreifung und Ausschüttung von Zellen aus dem Knochenmark weiterhin als gerechtfertigt betrachten.

A.4.2. Eigenes Vorgehen

Die vorliegende Arbeit sollte einen weiteren Schritt zur Klärung der Einflußnahme der Milz auf das periphere Blutbild, insbesondere auf das Verhalten der Leukocyten darstellen. Die unter A.4.1. skizzierten Beobachtungen bieten sichere Anhaltspunkte dafür, daß die Milz ihre physiologischen und pathologischen Funktionen zu einem nicht unbedeutenden Teil auf humoralem Wege ausübt. Darauf fußte nun unsere Annahme, daß durch Injektion von Milzextrakten eine Funktionssteigerung der Milz zu imitieren sei, die einen besseren Einblick in die normalerweise vorhandenen Verhältnisse geben sollte.

B. METHODIK

B.1. Tiere

B.1.1. Intakte Mäuse

Die Wirkung der Organextrakte auf das weiße Blutbild untersuchten wir an weiblichen Albinomäusen vom Stamm NMRI/Han (Zentralinstitut für Laboratoriumstiere, Hannover). Diese wie auch alle übrigen Mäuse wogen zum Zeitpunkt der Untersuchung 20g bis höchstens 30g.

B.1.2. Mäuse mit lymphatischer Leukämie

B.1.2.a. Chronisch lymphatische Leukämien

Wir untersuchten die Wirkung von Milzextrakt an männlichen und weiblichen Mäusen des Stammes C 58/J (Jackson Laboratories, Chicago), die zwischen dem sechsten und achten Lebensmonat eine virusbedingte Leukämie entwickeln. Als leukämisch betrachteten wir die Tiere, die im Differentialblutbild 90%, mindestens aber über 80% lymphatische Zellen aufwiesen.

B.1.2.b. Akute lymphatische Leukämie

Ein zeitlich besser überschaubares Modell für die Untersuchungen bei Leukämien boten weibliche Mäuse des Stammes C 57 Bl 6/J. Bei diesem Stamm wurde zufällig eine spontane akute lymphatische Leukämie entdeckt. Die leukämischen Zellen lassen sich ge-

sunden Tieren desselben Stammes übertragen, so daß die Empfänger nach ungefähr einer Woche das Vollbild der Erkrankung zeigen. Die Überlebenszeit nach Transplantation beträgt zwischen 9 und 11 Tagen. +)

Wir injizierten gesunden Tieren intraperitoneal eine Suspension von Milzzellen erkrankter Tiere, wobei jedes Tier 1×10^6 Zellen erhielt. Nach sieben Tagen hatte sich eine Leukocytose von etwa 50 000/mm^3 entwickelt. Der Anteil der mononukleären Zellen betrug um 85%.

B.1.3. Ratten

Zu den unten beschriebenen Hypersplenieversuchen dienten männliche Albinoratten mit einem Gewicht von etwa 150g, die wir von einem örtlichen Züchter bezogen.

B.1.4. Haltung der Tiere

Alle Tiere wurden in Gruppenkäfigen gehalten und mit Altromin(Altromin GmbH.,Lage) und Wasser ad libitum ernährt.

+) Für die freundliche Überlassung von erkrankten Tieren danken wir Herrn Dr.W.Mempel vom Institut für Hämatologie der GSF München, Landwehrstraße.

B.2. Versuche mit Methylcellulose zur Erzeugung von hypersplenen Tiermilzen

B.2.1. Ratten

Nach dem von PALMER und Mitarbeitern angegebenen Verfahren (54) erzeugten wir mit Methylcellulose (je 2 ml 2,5%ige Lösung, Injektion zweimal in der Woche, 16 Wochen lang) eine Splenomegalie.

B.2.2. Mäuse

Bei Mäusen (NMRI/Han) versuchten wir, ein ähnliches Bild zu erzeugen und injizierten 10 Wochen lang zweimal pro Woche je 0,5 ml 2,5%iger Methylcellulose-Lösung intraperitoneal.

B.2.3. Auswertung

Nach Gabe von insgesamt 64 ml Methylcellulose-Lösung bei Ratten bzw. 10 ml bei Mäusen wurden Blutbilder angefertigt und anschließend die Tiere in Äthernarkose getötet. Die Milzen wurden entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -15°C aufbewahrt.

B.3. Herstellung verschiedener Organextrakte

B.3.1. Organe

Bis zu ihrer Verarbeitung wurden die verschiedenen Gewebe bei -15°C aufbewahrt. Wir gewannen Extrakte aus:

- Kälbermilzen, die frisch vom Schlachthof geholt wurden;
- Rattenmilzen (normal und hypersplen);
- Rattenlebern und
- Rattenlungen als Kontrollen.

B.3.2. Einfacher Milzextrakt (Mex)

Eine bestimmte Menge Gewebe wurde zerkleinert, mit der fünffachen Menge Aqua bidest. circa 2 - 3 Minuten im vorgekühlten Gefäß mit dem Ultraturrax (Fa. Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert und in einen Dialysierschlauch mit einem mittleren Porenradius von 24Å (Visking Dialysierschlauch Typ 27/32) eingebracht. Das Homogenat wurde 24 Stunden lang bei +4°C gegen die zehnfache Menge Aqua bidest. dialysiert. Dadurch erfolgte die Abtrennung von Substanzen mit einem Molekulargewicht über 15000. Um bakterielle Verunreinigungen unwirksam zu machen, setzten wir der Dialyseflüssigkeit etwa 2,5 mg/l Penicillin zu. Das Dialysat wurde bei +40°C und einem

Wasserdampfdruck von 30 - 60 mmHg im Rotavapor (Fa. Büchi, Schweiz) eingedampft, der Rückstand in 80 ml Aqua bidest. aufgenommen, filtriert und säulenchromatographisch gereinigt.

Die so gewonnenen Fraktionen, deren Molekulargewichte ungefähr zwischen 1000 und 5000 lagen, wurden nochmals eingedampft und ein zweites Mal mit dem Molekularsieb gereinigt und dann getrocknet. Der letzte Trockenrückstand wurde schließlich in so viel physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, daß 0,1 ml Lösung zwei Gramm Frischgewebe entsprachen. Unter Zusatz von 1 - 2 mg Penicillin wurden diese Extrakte bis zur Verwendung bei -15°C aufbewahrt.

B.3.3. Leber- und Lungenextrakt

Extrakte aus diesen Geweben wurden auf die selbe Weise hergestellt wie der einfache Milzextrakt.

B.3.4. Erhitzter Milzextrakt (80°)

Die Herstellung erfolgte wie oben beschrieben, das Dialysat wurde jedoch zwei Stunden lang im Rotavapor bei +80°C eingeengt.

B.3.5. Herstellung von Extrakten unter Verwendung organischer Lösungsmittel

Um eine mögliche Lipoidlöslichkeit der gesuchten Wirkstoffe zu prüfen, verwendeten wir zu Extraktion Methanol bzw. Chloroform-gesättigtes Wasser als Elutionsmittel.

B.3.5.a. Methanolextrakt I (OH I)

Eine bestimmte Menge Milz wurde mit der vierfachen Menge eines Methanol-Wasser-Gemisches (4 Teile Methanol, 1 Teil Aqua bidest.) im Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 Minuten lang in der Kälte zentrifugiert und der Überstand eingedampft. Um das starke Schäumen der eiweißreichen Lösung dabei zu vermindern, wurden einige Tropfen Octanol zugesetzt.

Der Rückstand wurde erneut in Methanol-Wasser-Gemisch aufgenommen, diesmal in einem Zehntel der Menge des Gesamthomogenats, und zentrifugiert. Der Überstand wurde eingedampft. Der Rückstand war verhältnismäßig schlecht löslich und mußte deshalb nach Aufnahme in Aqua bidest. filtriert werden. Die Endkonzentration war wiederum so gewählt, daß 0,1 ml Lösung zwei Gramm Frischmilz entsprachen.

B.3.5.b. Methanolextrakt II (OH II)

Die Herstellung erfolgte wie beim Methanolextrakt I. Daran schloß sich eine zweimalige säulenchromatographische Reinigung an. Weitere Aufbereitung wie unter B.3.2.

B.3.5.c. Chloroform-Elution ($CHCl_3$)

Statt Aqua bidest. wurde bei der säulenchromatographischen Reinigung Chloroform-gesättigtes Wasser verwendet. Alle anderen Arbeitsgänge erfolgten in derselben Weise wie unter B.3.2.

B.3.6. Herstellung von Extrakten unter veränderten Dialysebedingungen

Veränderungen der Dialysebedingungen sollten Rückschlüsse auf eine eventuell vorhandene Bindung der Wirkstoffe an Proteine ermöglichen.

B.3.6.a. Dialyse mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl)

Hierbei wurde statt des sonst bei der Dialyse verwendeten Aqua bidest. die Dialysierflüssigkeit mit Ammoniumchlorid auf pH 5,6 angesäuert. Alle anderen Schritte verliefen wie unter B.3.2.

B.3.6.b. Konzentrierte Dialyse (Ko)

100g Kälbermilz wurden mit 500ml Aqua bidest. homogenisiert und 30 Minuten lang in der Kälte zentrifugiert. Der Überstand wurde lyophilisiert und die Trockensubstanz in 50ml Aqua bidest. aufgenommen. Diese Lösung wurde unter üblichen Bedingungen gegen die zehnfache Menge Aqua bidest. dialysiert. Die weitere Verarbeitung des Dialysats wurde wie unter B.3.2. vorgenommen.

B.4. S ä u l e n c h r o m a t o g r a p h i e

B.4.1. Reinigung der Extrakte

Zum "Entsalzen" der Extrakte verwendeten wir Säulen mit den Maßen 6 x 50cm, Füllung mit Sephadex G 10 (Fa. Serva, Heidelberg).

Nach Entlüften der Säule mit einer Wasserstrahlpumpe wurden das zu trennende Material in 80ml Aqua bidest. gelöst, durch Pumpensog (Peristaltic - Pumpe, Modell Re-CyChrom, LKB) aufgetragen und anschließend 20ml Aqua bidest. nachgesaugt. Als Elutionsmittel verwendeten wir ebenfalls Aqua bidest. mit einem Zusatz von 5mg/l Penicillin.
Die Durchflußgeschwindigkeit betrug im Mittel 100ml/Stunde. Die Trennung erfolgte bei Zimmertemperatur.
Die Fraktionen mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 wurden im Radirac (Fa.LKB) gesammelt.

Zur Definierung der Ausschlußvolumina wurde die Säule mit Cyanocobalamin (MG 1350), Polyäthylenglykol (MG 3350), Insulin (MG 5800) und hochmolekularem Dextranblau "geeicht".

B.4.2. Auftrennung der Extrakte

Zur weiteren Auftrennung des Gesamtmilzextraktes wurde eine 5 x 150cm Säule, Füllung mit Sephdex G 25 verwendet. Der gereinigte Extrakt (entsprechend 30g Frischmilz) wurde in 5ml Aqua bidest. gelöst und durch Pumpensog aufgetragen. Dann wurden zum Spülen nochmals 20ml Aqua bidest. nachgesogen. Elutionsmittel, Durchflußgeschwindigkeit und Sammeln wie unter B.4.1.
Die Extinktion wurde bei 220 nm mit einer Quarz-

durchflußkuvette gemessen und aufgezeichnet (Spektralphotometer DB-G, Fa. Beckmann). Das Eluat wurde nach Peaks unterteilt, die einzelnen Portionen lyophilisiert (Gefriertrockner Modell Gamma, Fa. Christ, Osterode) und in je 1,5ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

B.5. Tierversuche

B.5.1. Injektion und Dosierung der Extrakte

Zur intraperitonealen Injektion erhielten die Mäuse eine leichte Äthernarkose. Der Unterbauch wurde mit Merfen oder Spiritus dilutus desinfiziert. Mit einer Einmalkanüle Nr.20 wurden je 0,1 ml Extrakt oder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle injiziert.

B.5.2. Blutentnahme und Auswertung

Zu verschiedenen Zeitabständen nach der Injektion wurde den Tieren in leichter Äthernarkose Blut aus einer Schwanzvene entnommen, nachdem zuvor der Schwanz in 45 -50°C warmem Wasser hyperämisiert worden war. Von jedem Tier wurde nur einmal Blut entnommen, um Reaktionen von Seiten des blutbildenden Apparates auf häufige Entnahmen zu vermeiden (41). Die Leukocyten und verschiedentlich auch die Erythrocyten wurden im Coulter Counter (Modell B,

Coulter Electronics, London) gezählt. Die Ausstriche wurden in üblicher Weise nach Pappenheim gefärbt. Für das Differentialblutbild wurden je 200 Zellen ausgezählt.

B.6 S t a t i s t i s c h e A u s w e r t u n g

Die unterschiedlich behandelten Gruppen bestanden nach Möglichkeit aus 10, mindestens jedoch aus 8 Tieren.

Die Relativzahlen aus den Differentialblutbildern wurden in absolute Zellzahlen umgerechnet. Von diesen bestimmten wir pro Kollektiv:

- den Mittelwert $\bar{x}$
- den Medianwert $\tilde{x}$
- die Standardabweichung des Mittelwerts $s_{\bar{x}}$
- die Standardabweichung s
- den Variationskoeefizienten $V_k = s/\bar{x}$

Der statistische Vergleich erfolgte nur mit den absoluten Zahlen.

Die Berechnung der Signifikanzen wurde entsprechend den Anleitungen im Lehrbuch von SACHS (64), 3.Auflage, unter Zugrundelegung der Wissenschaftlichen Tabellen Documenta Geigy (78) durchgeführt.

Da die jeweils vorliegenden Verteilungen nicht bekannt waren und eine grobe Orientierung mit dem

David-Test zum Teil für das Vorliegen nicht normalverteilter Stichproben sprach, wurden Vergleiche von unabhängigen Stichproben mit dem Test auf Homogenität von Kolmogoroff und Smirnoff durchgeführt. Bei abhängigen Stichproben wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen angewendet. Die Prüfung auf bedeutsame Unterschiede erfolgte bei zweiseitiger Fragestellung auf dem 5%-Niveau.

Die Berechnung von Korrelationen erfolgte mit der von Spearman angegebenen Methode, die wiederum nicht an die Voraussetzung der Normalverteilung gebunden ist.

Alle Rechnungen wurden mit dem Tischcomputer Programma 101 (Fa. Olivetti) durchgeführt.

C. E R G E B N I S S E

C.1. H y p e r s l e n i e - V e r s u c h e m i t M e t h y l c e l l u l o s e

C.1.1. Ratten

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden insgesamt 31 Ratten mit identischen Mengen Methylcellulose behandelt. In Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von PALMER und Mitarbeitern (54) lagen die Erythrocyten- und Leukocytenwerte nach 16wöchiger Behandlung unter denen der unbehandelten Vergleichstiere. Diese Erniedrigung ging zu Lasten der Lymphocyten, die signifikant vermindert waren. Die Granulocyten lagen im Normbereich (Abb. S.81 - 82).

Zwei Tiere fielen durch eine Erhöhung der Leukocyten auf. Eine gewisse Linksverschiebung im Differentialblutbild spricht wohl am ehesten für eine Infektion als Ursache der Leukocytose.
Statistisch lassen sich die Leukocyten- und Granulocytenwerte beider Tiere als "Ausreißer" nachweisen. Da wir jedoch zum Vergleich verteilungsunabhängige Tests benutzt haben, fallen diese Werte bei der Rechnung nicht ins Gewicht.

Da die Ergebnisse einer Behandlung mit Methylcellulose (Vergrößerung der Milz, Cytopenie im peripheren Blutbild) von früheren Autoren (54) als

Modell für eine splenogene Markhemmung betrachtet wurden, stellten wir aus diesen "hypersplenen" Milzen Extrakte her und prüften ihre Wirkung auf das weiße Blutbild bei Mäusen (s.a.Abschn.C.3.3., C 4.4.)

C.1.2. Mäuse

Ein ähnliches Ergebnis der Behandlung mit Methylcellulose konnten wir bei Mäusen nicht erzielen. Der Versuch wurde nach 10 Wochen abgebrochen, als von 35 eingesetzten Tieren nur noch 20 lebten. Die Milzen der verendeten Tiere waren normal klein. Eine Todesursache war nicht bekannt.
Eines der überlebenden Tiere zeigte bei normalen Erythrocytenwerten und unauffälligem Differentialblutbild eine Leukocytose von 35000/mm^3. Die entsprechenden Werte wurden bei der Auswertung nicht mit berücksichtigt.
Ein weiteres Tier zeigte eine Granulocytose von 78,5% (=14 561 Zellen/mm^3) ohne Linksverschiebung.

Im übrigen unterschied sich die Zahl der weißen Blutkörperchen der anderen Tiere nicht von der unbehandelter Tiere. Bei den roten Blutkörperchen hingegen zeigte sich eine signifikante Verminderung nach Methylcellulose. (Abb.S.83 - 84)
Bei der Sektion fanden wir insgesamt vergrößerte Milzen, jedoch keinen Anhalt für einen "Hypersplenismus", d.h. die typische Verminderung der Leukocyten fehlte.

Deshalb wurde aus den Mäusemilzen kein Extrakt hergestellt.

C.2. Einfacher Milzextrakt

Die Wirkung einfachen Kälbermilzextraktes wurde an intakten Mäusen des Stammes NMRI/Han geprüft. Die Ergebnisse wurden jeweils mit einem Kontrollkollektiv, das unter gleichen Bedingungen physiologische Kochsalzlösung bekommen hatte, und einem unbehandelten, zu einem anderen Zeitpunkt bestimmten Kollektiv verglichen. Die Blutbildkontrollen fanden 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Injektion statt. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Tageszeiten untersucht, die Auswahl erfolgte zufällig.

Nach der Injektion des Milzextraktes zeigten die Tiere teilweise ein auffälliges Verhalten: etwa 15 Minuten p.i. bewegten sie sich zusehends träger und blieben schließlich in einer Ecke des Käfigs hocken, wobei die Augen halb geschlossen und das Fell gesträubt waren. Mit Kochsalzlösung behandelte Tiere zeigten keine Besonderheiten.

C.2.1.a. Verhalten der Leukocyten nach Milzextrakt

(Abb. 1 und S.85-88)

Zwei Stunden nach der Injektion waren die Leukocyten deutlich gegenüber den unbehandelten Tieren abgesunken. Die Leukopenie hielt bis zu 24 Stunden nach der Injektion an. Nach 48 Stunden fanden sich etwa normale Werte, nach 72 und 96 Stunden zeigte sich eine Leukocytose. Der Anstieg der Leukocyten von der zweiten Stunde ab war hochsignifikant mit der Zeit korreliert.

C.2.1.b. Verhalten der Leukocyten nach Kochsalzlösung

(Abb. 1 und S.85-88)

Auch nach Kochsalz-Injektion fielen die Leukocyten ab, um dann anzusteigen. Nach 48 Stunden war eine signifikante Erhöhung der Zellen gegenüber dem unbehandelten Kollektiv zu verzeichnen. Der Anstieg von der zweiten bis zur 48. Stunde zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation mit der Zeit.

C.2.1.c. Vergleich der Leukocyten nach Milzextrakt und nach Kochsalzlösung

Der Vergleich der verschiedenen Behandlungsweisen zur jeweils selben Zeit zeigt eine stärkere Abnahme der Leukocyten unter Milzextrakt nach 2 und 4 Stunden. Nach 8 Stunden besteht zwischen beiden Gruppen kein statistisch zu sichernder Unterschied. Nach 24 und 48 Stunden liegen die Kochsalzwerte deut-

lich über den Milzextraktwerten. Nach 72 Stunden jedoch überschreiten die Leukocyten unter Milzextrakt diejenigen unter Kochsalzlösung, signifikant. Nach 96 Stunden sind beide Zellgruppen so angestiegen, daß kein Unterschied mehr zu sichern ist.

Tabelle 1.: Signifikante Unterschiede bei L e u k o c y t e n (zweiseitige Fragestellung, 5%-Niveau. ns = nicht signifikant)

Std. p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
Mex vs. unbeh.	ns	+	+	+	+	ns	+	+
NaCl vs. unbeh.	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns	ns
Mex vs. NaCl	ns	+	+	ns	+	+	+	ns

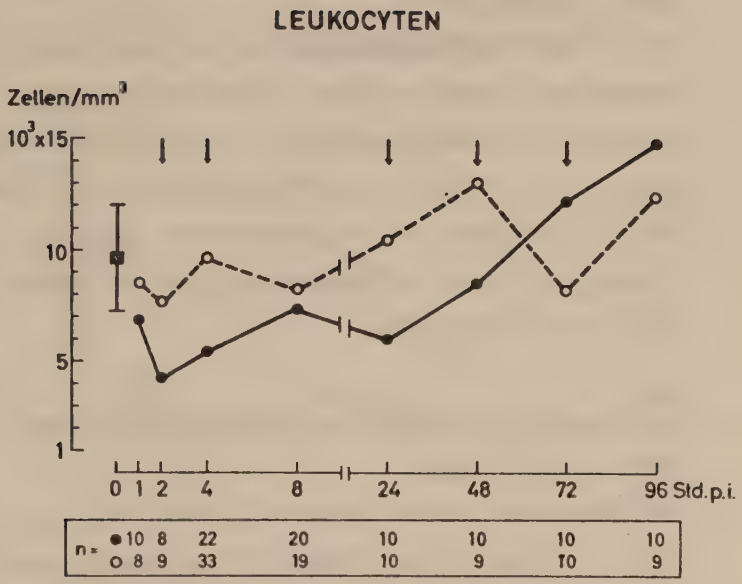


Abb. 1: Verhalten der L e u k o c y t e n nach Injektion von Milzextrakt (•——•) und physiologischer Kochsalzlösung (o---o) in Abhängigkeit von der Zeit. Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kontrollkollektivs (n=30) eingezeichnet. Die mit Pfeilen markierten Werte sind statistisch signifikant verschieden. n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv

C.2.2.a. Verhalten der Granulocyten nach Milzextrakt

(Abb. 2 und S.89-92)

Zwei Stunden nach der Injektion fand sich eine ausgeprägte Granulocytopenie. Dann stiegen die Zellen an und überstiegen nach 8 Stunden den Ausgangswert um mehr als das Dreifache. Noch 24 Stunden p.i. fand sich eine Granulocytose. Nach 48 Stunden und in der folgenden Zeit war sie jedoch nicht mehr nachweisbar.

C.2.2.b. Verhalten der Granulocyten nach Kochsalzlösung

(Abb. 2 und S.89-92)

Der Kochsalzinjektion folgte ein Abfall der Granulocyten, der nach 4 Stunden signifikant gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt war. Darauf folgte ein Anstieg, bis nach 48 Stunden die Granulocyten deutlich über den Ausgangswert angestiegen waren. In der 72. und 96. Stunde lagen die Granulocyten wieder im Normbereich.

C.2.2.c. Vergleich der Granulocyten nach Milzextrakt und nach Kochsalzlösung

In den ersten beiden Stunden nach der Injektion lagen die Granulocytenwerte unter Milzextrakt signifikant niedriger als die unter Kochsalzlösung. Nach der zweiten Stunde stiegen die Granulocyten unter Milzextrakt an, so daß bis zur 24.Stunde eine Granulocytose bestand. Nach 48 Stunden überwog dann

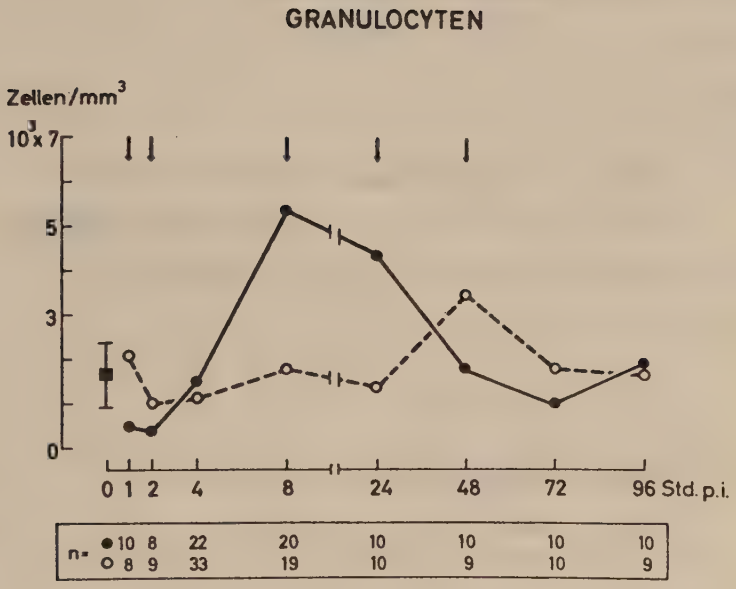


Abb. 2: Verhalten der G r a n u l o c y t e n nach Injektion von Milzextrakt (●——●) und physiologischer Kochsalzlösung (o---o) in Abhängigkeit von der Zeit. Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kontrollkollektivs (n=30) eingezeichnet. Die mit Pfeilen markierten Werte sind statistisch signifikant verschieden.

n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv

die Erhöhung der Granulocyten bei den mit Kochsalz behandelten Tieren. Nach dieser Zeit waren keine Unterschiede mehr nachweisbar.

Tabelle 2.: Signifikante Unterschiede bei G r a n u l o c y t e n (Zweiseitige Fragestellung, 5%-Niveau. ns = nicht signifikant)

Std. p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
Mex vs. unbeh.	ns	+	ns	+	+	ns	ns	ns
NaCl vs. unbeh.	ns	ns	+	ns	ns	+	ns	ns
Mex vs. NaCl	+	+	ns	+	+	+	ns	ns

C.2.3. Kernverschiebungsindex (Abb. 3)

An Hand des Kernverschiebungs-Index läßt sich das Verhältnis von jugendlichen zu reifen Granulocyten beurteilen. Unser Normalwert war wohl in Anbetracht des Niveaus der unter Versuchsbedingungen gewonnenen Kurvenverläufe zu hoch bestimmt. Die Einzelwerte bewegten sich zwischen 0,0 und 0,8, der Variationskoeffizient lag über 100%. Es erscheint deshalb vertretbar, sich bei der Beurteilung der Kurven nicht auf diesen Wert zu beziehen, sondern den Normalwert bei etwa 0,02 zu sehen.

C.2.3.a. Verhalten des Kernverschiebungs-Index nach Milzextrakt (Abb. 3)

Zwischen den Granulocytenzahlen im peripheren Blut und dem Verhalten des Kernverschiebungs-Index ließ sich eine wechselseitige Beziehung feststellen. Dem initialen Abfall der Granulocyten nach Milzextrakt folgte ein erster Anstieg des Kernverschiebungs-Index. Vier Stunden nach der Injektion fanden sich normale Granulocytenwerte, der Kernverschiebungs-Index nahm ab. Dann jedoch stiegen die Zellzahlen in der 8.Stunde gemeinsam mit dem Kernverschiebungs-Index an. Die Granulocytose war also von einer Vermehrung jugendlicher Zellen begleitet.

In den folgenden Stunden sank die Zahl der Granulocyten wieder ab. Als nach 72 Stunden niedrig-normale Werte erreicht waren, stieg als gegenregu-

latorische Maßnahme der Kernverschiebungs-Index wieder an. Mit Normalisierung der Granulocyten nach 96 Stunden lag auch der Kernverschiebungs-Index wieder tief.

C.2.3.b. Verhalten des Kernverschiebungs-Index nach Kochsalzlösung (Abb.3)

Anders verhielt sich der Kernverschiebungs-Index nach Kochsalzlösung. Während die Granulocyten noch im Normbereich lagen, stieg der Kernverschiebungs-Index nach 24 Stunden steil an. Darauf folgte ein Anstieg der Gesamtgranulocyten im peripheren Blut etwa 24 Stunden später. (Daß der Gipfel der Granulocytose unter Kochsalz etwas früher erschien, ist bei den großen Intervallen zwischen den Untersuchungen sehr wohl möglich,)

Zur Zeit der Granulocytose lag der Kernverschiebungs-Index im Gegensatz zum Milzextrakt-Kollektiv wieder bei niedrigen Werten und blieb auch so während der Normalisierung der Granulocytenwerte in den folgenden Stunden.

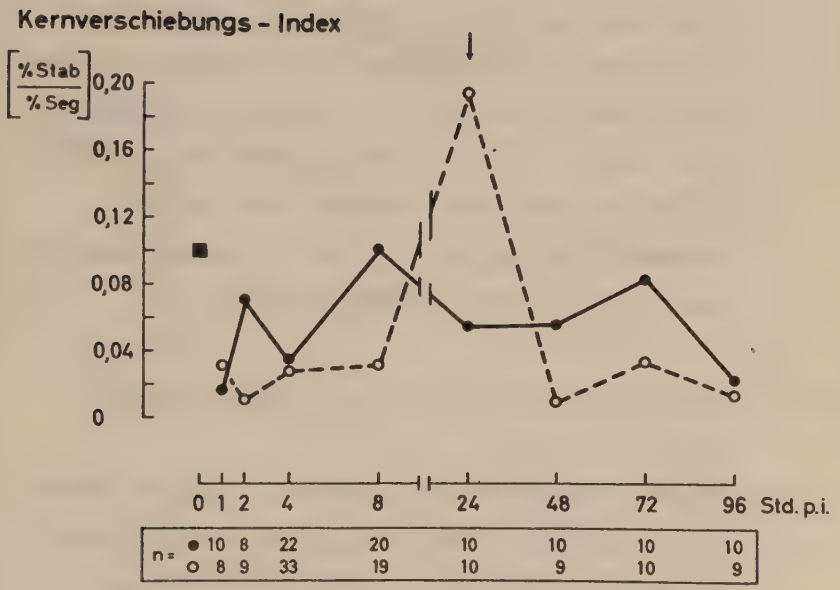


Abb. 3: Änderung des K e r n v e r s c h i e b u n g s - I n d e x (Verhältnis der stabkernigen zu den segmentkernigen neutrophilen Granulocyten) nach Injektion von Milzextrakt (●——●) und physiologischer Kochsalzlösung (o- - -o) in Abhängigkeit von der Zeit. Zum Zeitpunkt 0 ist der Mittelwert eines unbehandelten Kontrollkollektivs (n=30) eingezeichnet. Die mit Pfeil markierten Werte sind statistisch signifikant verschieden.

n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv

C.2.4.a. Verhalten der Lymphocyten nach Milzextrakt

(Abb. 4 und S. 93-96)

Der Abfall der Lymphocyten nach der Injektion war ab der zweiten Stunde signifikant gegenüber dem Ausgangswert. Die Lymphopenie hielt bis zu 24 Stunden an. 48 Stunden nach der Injektion von Milzextrakt fanden sich im Ausstrich vermehrt jugendliche Lymphocyten bzw. Lymphoblasten, die Zellzahlen stiegen wieder an. Nach 72 und 96 Stunden lagen sie sogar höher als bei unbehandelten Tieren.

C.2.4.b. Verhalten der Lymphocyten nach Kochsalzlösung

(Abb. 4 und S. 93-96)

Die geringe Abnahme der Lymphocyten nach Kochsalzinjektion war statistisch nicht zu sichern. Ein Anstieg nach 48 Stunden überstieg jedoch signifikant den Wert bei unbehandelten Tieren. In der folgenden Zeit bewegten sich die Lymphocyten um den Ausgangsbereich.

C.2.4.c. Vergleich der Lymphocyten nach Milzextrakt und Kochsalzlösung

Bis zur 48. Stunde p.i. lagen die Lymphocytenwerte der mit Milzextrakt behandelten Tiere deutlich unter denen der mit Kochsalz behandelten. Nach 72 Stunden überstiegen die Lymphocyten unter Milzextrakt die unter Kochsalzlösung signifikant. Nach 96 Stunden

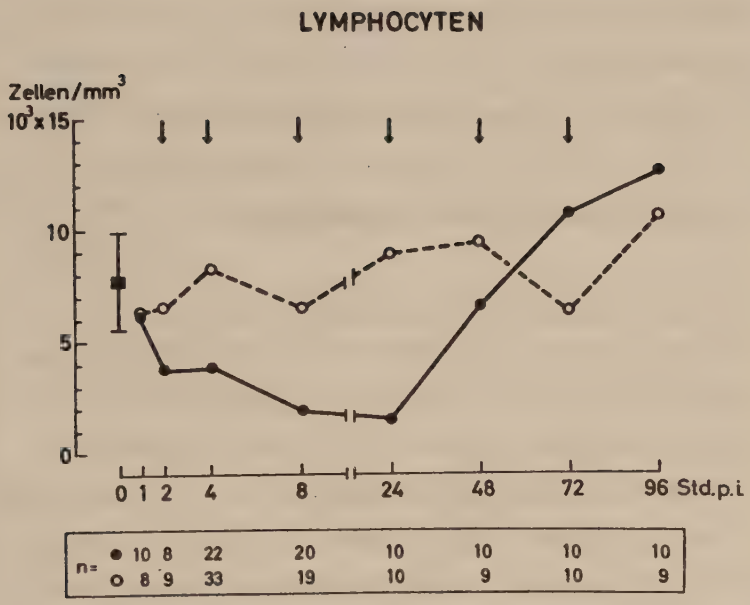


Abb. 4: Verhalten der L y m p h o c y t e n nach Injektion von Milzextrakt (●——●) und physiologischer Kochsalzlösung (o---o) in Abhängigkeit von der Zeit. Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kontrollkollektivs (n=30) eingezeichnet. Die mit Pfeilen markierten Werte sind statistisch signifikant verschieden.

n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv

waren zwischen beiden Gruppen statistisch keine Unterschiede mehr nachzuweisen.

Tabelle 3.: Signifikante Unterschiede bei L y m - p h o c y t e n (Zweiseitige Fragestellung, 5%-Niveau. ns = nicht signifikant)

Std.p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
Mex vs. unbeh.	ns	+	+	+	+	ns	+	+
NaCl vs. unbeh.	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns	ns
Mex vs. NaCl	ns	+	+	+	+	+	+	ns

C.2.5. Lymphocyten-Index

In Anlehnung an den Begriff des Kernverschiebungs-Index bezeichnete DOUGHERTY (21) das Verhältnis von großen, unter Belastung vermehrt auftretenden, sogenannten Stress-Lymphocyten zu kleinen Lymphocyten als "Lymphocyten-Index".

C.2.5.a. Verhalten des Lymphocyten-Index nach Milzextrakt (Abb. 5)

In den ersten beiden Stunden nach der Injektion liegt der Index verhältnismäßig niedrig. In dieser Phase des Lymphocytenabfalls sind also die Stress-Lymphocyten stärker betroffen als die kleinen Lymphocyten. Vier Stunden p.i. verändert sich aber dann das Bild: der Lymphocyten-Index steigt und und zeigt somit ein relatives Überwiegen der großen Lymphocyten an. Die Bestimmungen in den folgenden Stunden lassen ein Plateau erkennen. Beide Zelltypen machen also den maximalen Abfall und den Wiederanstieg in gleicher Weise mit. Eine nochmalige Zunahme der Stress-Lymphocyten läßt sich in der letzten Phase 72 Stunden p.i. feststellen, in der die Gesamtlymphocyten den Ausgangswert beträchtlich überschreiten.

C.2.5.b. Verhalten des Lymphocyten-Index nach Kochsalzlösung (Abb. 5)

Die Bewegungen des Lymphocyten-Index nach Kochsalzinjektion sind weniger ausgeprägt als die

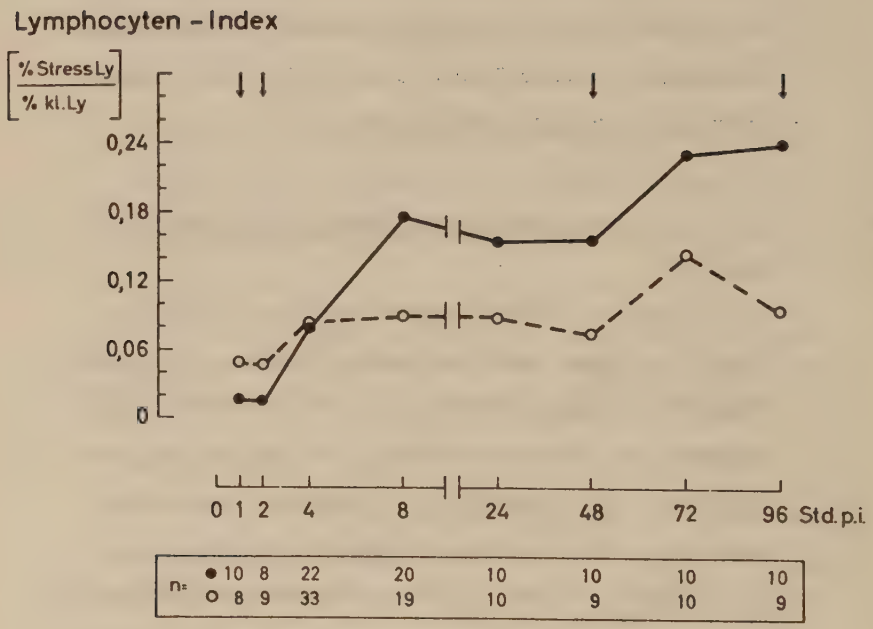


Abb. 5.: Verhalten des L y m p h o c y t e n - I n d e x nach Injektion von Milzextrakt (●——●) und physiologischer Kochsalzlösung (o---o) in Abhängigkeit von der Zeit. Die mit Pfeilen markierten Werte sind statistisch signifikant verschieden.

n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv

unter Milzextrakt. Nach einer anfänglichen leichten Senkung des Index innerhalb der ersten beiden Stunden p.i. findet sich von der vierten Stunde ab ein Plateau. Das Verhältnis der beiden Zelltypen verändert sich in der 72.Stunde nach der Injektion noch einmal, als die Gesamtlymphocyten unter Kochsalzlösung auf Kosten der kleinen Lymphocyten kurzfristig abnehmen. Nach 96 Stunden ist der Index wieder abgesunken, so daß im Vergleich zum Milzextrakt-Kollektiv ein signifikanter Unterschied besteht.

C.2.6.a. Verhalten der eosinophilen Granulocyten nach Milzextrakt (Abb. 6 und S.97-100)

Die Veränderungen der eosinophilen Granulocyten nach Milzextrakt waren durch ein wechselndes Auf und Ab gekennzeichnet. In der ersten Stunde nach der Injektion waren die Zellen unter das Vergleichskollektiv abgesunken. Nach vier Stunden zeigten sie eine zwischenzeitliche Erhöhung, um nach 8 Stunden wieder deutlich unter den Ausgangswert abzusinken. Dann jedoch stiegen sie kontinuierlich an und lagen ab der 72.Stunde wieder im Normbereich. Trotz der Erhöhung nach 4 Stunden zeigte sich eine signifikante zeitliche Abhängigkeit des Anstieges von der ersten Stunde an.

C.2.6.b. Verhalten der eosinophilen Granulocyten nach Kochsalzlösung (Abb. 6 und S. 97-100)

Die eosinophilen Granulocyten unter Kochsalz zeigten einen starken Abfall innerhalb der ersten beiden Stunden p.i. und eine Normalisierung in der folgenden Zeit. Die Werte ab der achten Stunde waren vom Normalkollektiv nicht mehr signifikant verschieden.

Tabelle 4.: Signifikante Unterschiede bei e o s i n o p h i l e n Granulocyten (Zweiseitige Fragestellung, 5%-Niveau. ns = nicht signifikant)

Std.p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
Mex vs. unbeh.	+	+	ns	+	ns	+	ns	ns
NaCl vs. unbeh.	ns	+	+	ns	ns	ns	ns	ns
Mex vs. NaCl	ns	ns	+	+	ns	+	ns	ns

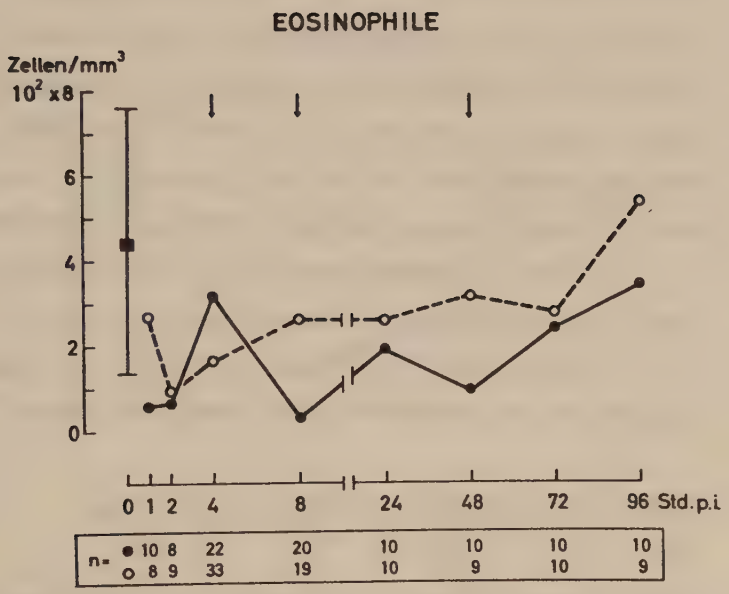


Abb. 6: Verhalten der e o s i n o p h i l e n Granulocyten nach Injektion von Milzextrakt (●——●) und physiologischer Kochsalzlösung (o---o) in Abhängigkeit von der Zeit. Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kontrollkollektivs (n=30) eingezeichnet. Die mit Pfeilen markierten Werte sind statistisch signifikant verschieden. n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv

C.2.7.a. Verhalten der Monocyten nach Milzextrakt

(Abb. 7 und S.101-104)

Nach Milzextrakt-Injektion sinken auch die Monocyten ab. In der zweiten Stunde p.i. fanden sich im Differentialblutbild sogar überhaupt keine Monocyten mehr. Sie erholten sich jedoch wieder und stiegen, signifikant mit der Zeit korreliert, wieder auf normale bis hochnormale Werte an. 96 Stunden p.i. schienen sie wieder abzusinken. Die relativen Werte waren jedoch weiter angestiegen und lagen mit 4,5% im Durchschnitt über dem Wert des Ausgangskollektivs, das im Mittel 2,35% Monocyten zeigte.

C.2.7.b. Verhalten der Monocyten nach Kochsalzlösung

(Abb. 7 und S.101-104)

Hier zeigten die Monocyten ebenfalls einen Abfall in den ersten beiden Stunden nach Injektion. Nach 4 Stunden war ein kleiner Anstieg zu beobachten. Ab der achten Stunde bewegten sich die Zellzahlen im unteren Normbereich.

Tabelle 5.: Signifikante Unterschiede bei M o n o c y t e n (Zweiseitige Fragestellung, 5%-Niveau. ns = nicht signifikant)

Std.p.i.	1	2	4	8	24	48	72	96
Mex vs. unbeh.	+	+	ns	+	ns	ns	ns	ns
NaCl vs. unbeh.	ns	+	ns	+	ns	ns	ns	ns
Mex vs. NaCl	ns	ns	ns	ns	ns	+	+	+

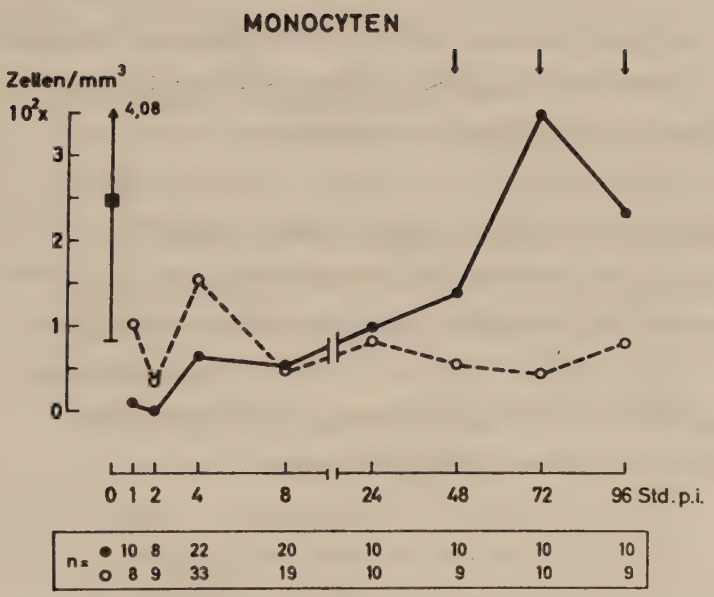


Abb. 7: Verhalten der M o n o c y t e n nach Injektion von Milzextrakt (•——•) und physiologischer Kochsalzlösung (o---o) in Abhängigkeit von der Zeit. Zum Zeitpunkt 0 sind Mittelwert und Standardabweichung eines unbehandelten Kontrollkollektivs (n=30) eingezeichnet. Die mit Pfeilen markierten Werte sind statistisch signifikant verschieden.

n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv

C.3. Prüfung von Extrakten nach vier Stunden

Mit modifizierten Verfahren hergestellte Extrakte wurden zum Teil vier Stunden nach der Injektion auf ihre Wirkung hin untersucht.

C.3.1.a. Methanolextrakt I (OH I) (Abb. 8 u.S.105)

Nach Applikation von Methanol-Milzextrakt I waren alle Zellarten im Vergleich zu denen unter einfachem Milzextrakt nach entsprechender Zeit signifikant erhöht. Es konnte mit diesem Extrakt keine Cytopenie erzielt werden.

Im Vergleich zu den mit Kochsalz behandelten und den unbehandelten Tieren blieben die Lymphocyten gleich, die Granulocyten und damit die Leukocyten stiegen an. Am selben Tag wurden als Kontrolle Tiere mit Kochsalzlösung behandelt. Im Vergleich zur Wirkung des Methanol-Extraktes ergaben sich hier keine Unterschiede, da dieses mit Kochsalz behandelte Kollektiv relativ hohe Werte zeigte.

C.3.1.b. Methanolextrakt II (OH II) (Abb. 8 u.S.105)

Mit diesemExtrakt konnte eine Senkung der Lymphocyten erreicht werden, die das gleiche Ausmaß wie die nach einfachem Milzextrakt hatte. Die Granulo-

cyten stiegen jedoch in weit stärkerem Maße an, so daß die Gesamtleukocytenzahl gegenüber Kochsalzkontrollen und Normaltieren nicht verändert war.

C.3.2. Konzentrierte Dialyse (Ko) (Abb.8 u.S.106)

Der Abfall der Gesamtleukocyten war gegenüber den Kontrollen nicht signifikant. Mit dem vergleichbaren Milzextrakt-Kollektiv ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede: die Zellzahlen lagen also genau zwischen Kochsalz- und Milzextrakt-Kontrollen.

Der Abfall der Leukocyten gegenüber dem unbehandelten und dem Kochsalz-Kollektiv beruhte vornehmlich auf einer Verminderung der Lymphocyten.

C.3.3. Methylcellulose-Rattenmilzextrakt (MC-Ra)(Abb.7)

Ausnahmsweise betrug die Konzentration hier nicht 2g Milz/0,1ml, sondern nur 0,5g/0,1ml.

Die Leukocytenwerte unterschieden sich nicht von denen der Kontrollen, damit jedoch von denen des vergleichbaren Milzextrakt-Kollektivs. Die Granulocyten waren stark erhöht, die Lymphocyten nur mäßig gesenkt. Sie lagen zwischen den Werten der Kontroll- und der Milzextrakt-Gruppe.

C.3.4. Leberextrakt (Abb. 8 u.S.106)

Auch nach der Injektion eines Extraktes aus Rattenleber fielen die Zellzahlen ab. Die Lymphocyten wurden stärker betroffen als nach Gabe von einfachem Milzextrakt, die Granulocyten stiegen hingegen stärker an, so daß die Gesamtleukocyten im Kontrollbereich lagen.

C.4. Prüfung von Extrakten nach 24 Stunden

Da sich im Laufe der Versuche ergab, daß der Abfall der Lymphocyten nach 24 Stunden am ausgeprägtesten war, testeten wir von da ab weitere Extrakte nach dieser Zeit.

C.4.1. Erhitzter Milzextrakt (80°) (Abb. 9 u.S.108)

Durch Erhitzen wurde die Wirksamkeit des Extraktes zwar reduziert, sie blieb aber im Wesentlichen erhalten, so daß keine statistisch relevanten Unterschiede zu dem mit einfachem Milzextrakt behandelten Kollektiv bestanden. Während im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur die Lymphocyten einen deutlichen Abfall zeigten, waren gegenüber den Kochsalzkontrollen neben den Lymphocyten auch noch die Leukocyten insgesamt vermindert.

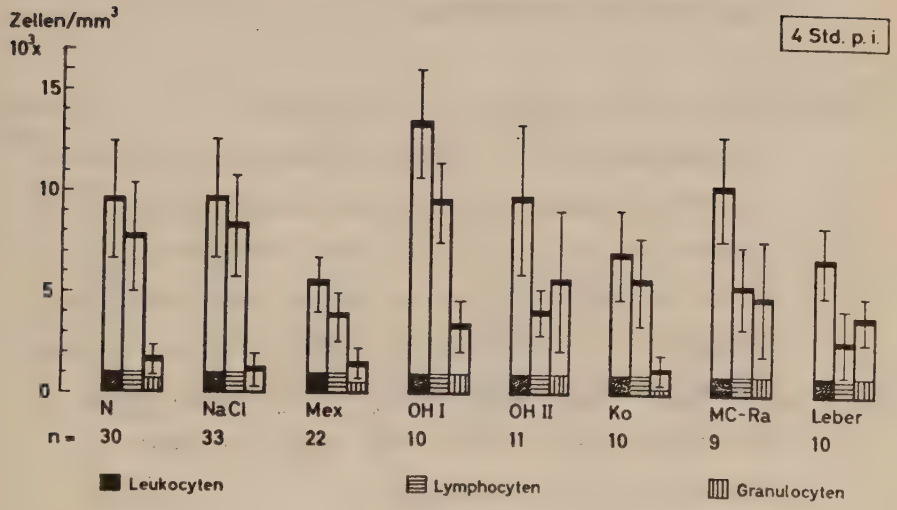


Abb. 8 : Gegenüberstellung der Wirkung der verschiedenen Extrakte (s.a.S. 42-44)auf das weiße Blutbild 4 Stunden nach Injektion. Eingezeichnet sind Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen (Werte s.Anhang), n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv.

C.4.2. Chloroform-Elution ($CHCl_3$) (Abb. 9 u.S.108)
Bis auf einen unbedeutenden Anstieg der Gr nulocyten brachte dieser Extrakt keine Veränderung gegenüber den Kontrollen.

C.4.3. Saure Dialyse (NH_4Cl) (Abb.9 u.S.107)
Die Ansäuerung des Dialysats erbrachte außer einer leichten Verminderung der Lymphocyten keine Dif - ferenzen zu den Kontrollen. Diese Verminderung erreichte aber nicht das Ausmaß wie nach einfachem Milzextrakt. Leukocyten und Granulocyten unterschieden sich weder von den Kontrollen noch vom Milzextrakt-Kollektiv signifikant, d.h. sie lagen zwischen beiden Gruppen.

C.4.4. Extrakte aus Rattenmilz (N-Ra) und Methylcellulose-Rattenmilz (MC-Ra) (Abb.9 u.S.109)
Zwischen der Wirkung von normaler und mit Methylcellulose "hypersplen" gemachter Rattenmilz ergaben sich keine Unterschiede. Die Leukocyten insgesamt unterschieden sich nicht von den unbehandelten und den Kochsalzkontrollen, sie lagen jedoch im Vergleich zum einfachen Milzextrakt bei normaler Rattenmilz höher, bei der "hypersplenen" Rattenmilz in gleicher Höhe. Die Granulocyten unter beiden Extrakten lagen genauso, die Lymphocyten höher als bei einfachem Milzextrakt. Das bedeutet also, daß die "hypersplene" Milz keine besondere lymphopenisierende Wirkung zeigte.

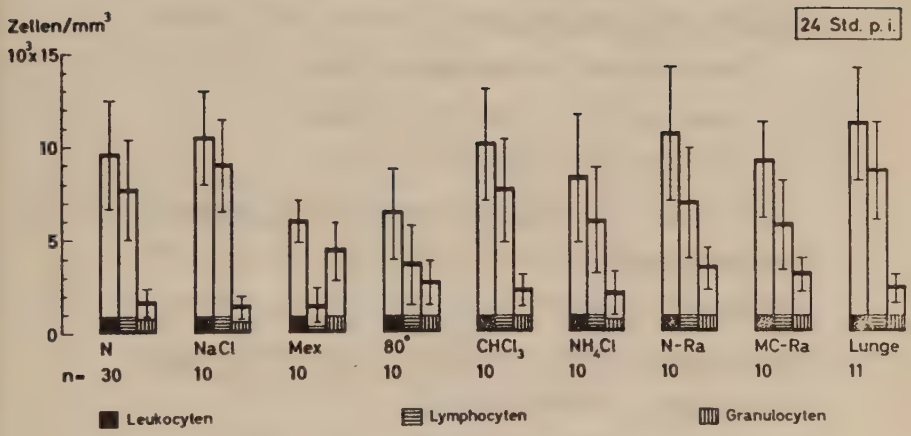


Abb. 9: Gegenüberstellung der Wirkung der verschiedenen Extrakte (s.a. S. 44-46) auf das weiße Blutbild 24 Stunden nach Injektion. Eingezeichnet sind Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen (Werte s. Anhang), n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv.

C.5. Fraktionierte Extrakte

C.5.1. Trennung in drei Fraktionen

Entsprechend der Extinktion wurde einfacher Milzextrakt in drei Fraktionen mit folgenden Molekulargewichten aufgetrennt:

Fraktion I : MG 5400 - 3700
Fraktion II : MG 3700 - 2900
Fraktion III : MG 2900 - 2000

Die Wirkung der Extrakte wurde nach acht und 24 Stunden geprüft.

C.5.1.a. Veränderungen nach Fraktion I, II und III nach acht Stunden (Abb. S.110-113)

Als einzige sichere Wirkung fand sich eine Erhöhung der Granulocyten nach Fraktion I und II. Bei Fraktion I war außerdem der Kenverschiebungs-Index stark erhöht.

C.5.1.b. Veränderungen nach Fraktion I, II und III nach 24 Stunden (Abb. S.110-113)

Alle Werte unter Fraktion I bewegten sich im Normbereich.

Unter Fraktion II und III waren die Lymphocyten und damit die Leukocyten erheblich angestiegen. Ähnlich hohe Werte traten bei keinem unserer anderen Extrakte auf. Die Ursache der Leukocytose ist

nicht bekannt. Vermutlich lag eine Verunreinigung des Extraktes oder eine Änderung seiner chemischen Zusammensetzung vor. Der Extrakt war nämlich, anders als bei vorhergegangenen Versuchen, nach dem Auftauen bis zur weiteren Verwendung noch einmal eingefroren worden. Eine Infektion der Mäuse kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

C.5.2. Trennung in vier Fraktionen

In einem weiteren Versuch wurde der Milzextrakt nochmals, diesmal in vier Fraktionen unterteilt:

Fraktion A : MG 4800 - 3800

Fraktion B : MG 3800 - 3100

Fraktion C : MG 3100 - 2700

Fraktion D : MG 2700 - 2000

Blutbildkontrollen erfolgten 8 und 24 Stunden p.i.

C.5.2.a. Wirkungsgleichheit (Abb. 10 und S.114-121)

Hinsichtlich der Zellzahlen (Erythrocyten, Leukocyten, Granulocyten und Lymphocyten) zeigten die Extrakte untereinander nur geringfügige Wirkungsunterschiede.

Die Leukocyten lagen zu beiden Zeiten im Bereich der unbehandelten Kontrollen.

Die Granulocyten waren nach 8 Stunden wie unter Vollmilzextrakt deutlich erhöht. Die Rückkehr zu

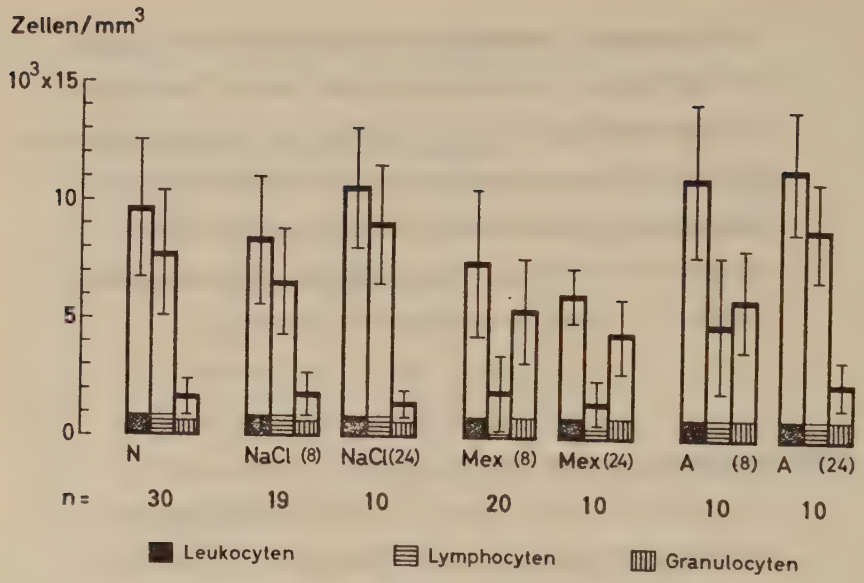


Abb.10: Gegenüberstellung der Wirkung von physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), Vollmilzextrakt (Mex) und der Fraktion A (s.a.S.49) auf das weiße Blutbild jeweils 8 und 24 Stunden nach Injektion (gekennzeichnet durch die in Klammern hinter die Abkürzung gesetzte Zahl) im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollkollektiv (N). Die Fraktion A steht hier repräsentativ für die übrigen Fraktionen B,C und D, deren Wirkungen auf die Gesamtzellzahlen keine statistisch zu sichernden Unterschiede zeigten. Eingezeichnet sind Mittelwerte und Standardabweichungen (Werte s.Anhang), n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv.

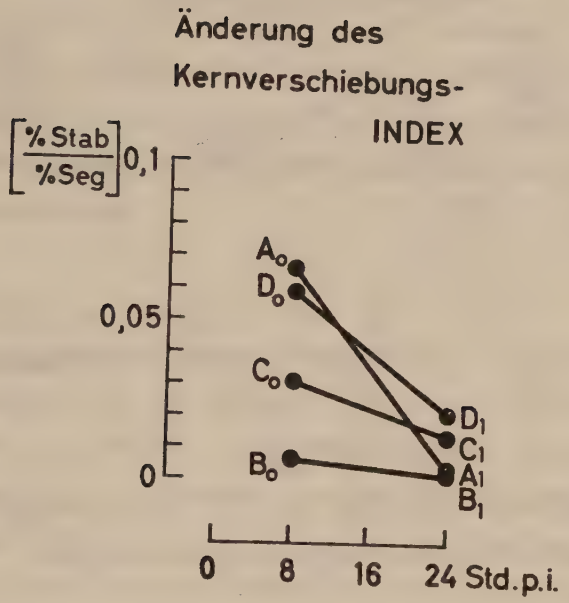


Abb. 11.a: Änderung des K e r n v e r s c h i e b u n g s - I n d e x in Abhängigkeit von der Zeit unter dem Einfluß der verschiedenen Milzextrakt-Fraktionen. Fraktionierung des Milzextraktes an Sephadex G 25 mit Aqua bidest. Angenäherte Molekulargewichte der einzelnen Fraktionen: A = 4800 - 3800, B = 3800 - 3100, C = 3100 - 2700, D = 2700 - 2000.
(s.a.Abb. 11.b.)

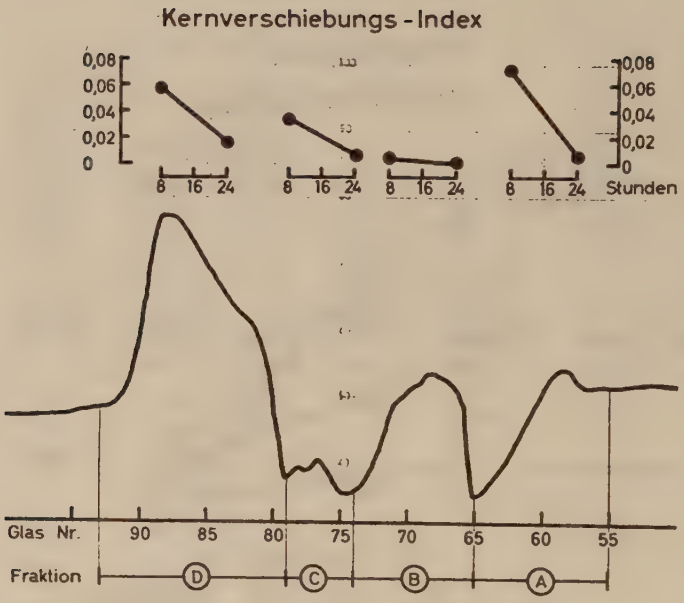


Abb. 11.b: Änderung des Kernverschiebungs-Index in Abhängigkeit von der Zeit unter dem Einflu3 der verschiedenen Milzextraktfraktionen, hier aufgetragen über dem zugehörigen Chromatogramm. Fraktionierung an Sephadex G 25 mit Aqua bidest. Angenäherte Molekulargewichte der einzelnen Fraktionen: A = 4800 - 3800, B = 3800 - 3100, C = 3100 - 2700, D = 2700 - 2000.

normalen Werten erfolgte schon innerhalb von 24 Stunden p.i., während die Granulocyten unter Vollextrakt noch deutlich erhöht waren.
Eine Lymphopenie nach 8 Stunden erreichte nicht das Ausmaß der Senkung unter Vollextrakt, und 24 Stunden p.i. lagen die Lymphocyten wieder im Normbereich.

C.5.2.b. Wirkungsunterschiede (Abb. 11 - 12)

Hinsichtlich des Kernverschiebungs-Index aber zeigten die verschiedenen Fraktionen unterschiedliche Wirkungen: die stärkste Abnahme in der Zeit von 8 bis 24 Stunden nach der Injektion zeigte er bei Fraktion A, die geringste bei Fraktion B. Relativ zur Menge enthaltenen Milzextraktes wies Fraktion C die stärkste Wirkung auf.

Für den Lymphocyten-Index ergibt sich bei Fraktion A eine starke, bei Fraktion B eine schwächere Zunahme. Bei Fraktion C nimmt die Anzahl der Stresslymphocyten nach 24 Stunden sogar ab, bzw. das Verhältnis verschiebt sich zugunsten der kleinen Lymphocyten.

Auf den zweiten Blick betrachtet enthält also der Vollmilzextrakt durchaus wirkungsdifferente, verhältnismäßig einfach zu trennende Komponenten.

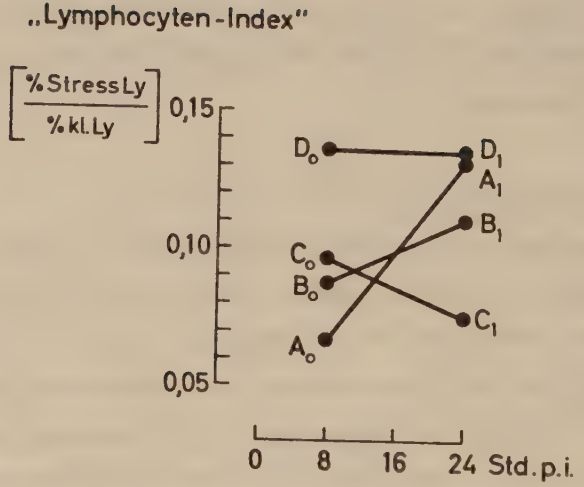


Abb. 12: Änderung des Verhältnisses von gro3en (sogenannten "Stress-Lymphocyten" nach DOUGHERTY) zu kleinen Lymphocyten in Abhängigkeit von der Zeit unter den Einflu3 der verschiedenen Milzextrakt-Fraktionen. Fraktionierung des Milzextraktes an Sephadex G 25 mit Aqua bidest. Angenäherte Molekulargewichte der einzelnen Fraktionen: A = 4800 - 3800, B = 3800 - 3100, C = 3100 - 2700, D = 2700 - 2000.

C.6. Untersuchungen bei chronisch lymphatischer Leukämie

Da wir in unserem Milzextrakt eine lymphocytensenkende Substanz erwarteten, prüften wir ihn an Tieren mit hoher Lymphocytenzahl. In zweimonatlichen Abständen wurden Blutbildkontrollen durchgeführt, um die erkrankten Tiere zu erfassen.

C.6.1. Altersabhängigkeit der Blutbilder

Bei wiederholten Kontrollen stellte sich heraus, daß unbehandelte jüngere Tiere höhere Granulocytenwerte zeigten als ältere Tiere. Für eine altersabhängige Zunahme der Lymphocyten fand sich jedoch auffälligerweise statistisch kein Anhalt. Dafür schien sich im Laufe der Zeit bei diesen Tieren eine Anämie auszubilden ($p = 0{,}1$).

C.6.2. Versuche mit Milzextrakt (Abb.S.122-125)

Zwei gleichgroßen Kollektiven wurde je drei Tage lang Milzextrakt und als Kontrolle physiologische Kochsalzlösung injiziert. Zehn Tage nach der ersten Injektion fand die erste und vier Wochen später die zweite Untersuchung des Blutbildes statt.

C.6.2.a. Vergleich unbehandelter Tiere mit Milzextrakt-behandelten nach 10 Tagen und 4 Wochen

Unter Milzextrakt sanken innerhalb der ersten zehn Tage nach Behandlung die Erythrocyten ab. Die stabkernigen neutrophilen und die eosinophilen Granulocyten stiegen an, während die segmentkernigen unauffällig blieben. Auch bei den Lymphocyten zeigte sich keine Änderung.

Nach vier Wochen entsprachen die Erythrocytenwerte denen vor Behandlung. Bei den Leukocyten ließ sich ein Anstieg der segmentkernigen neutrophilen und der eosinophilen Granulocyten sowie der Lymphocyten beobachten.

C.6.2.b. Vergleich unbehandelter Tiere mit Kochsalz-behandelten nach 10 Tagen und 4 Wochen

Nach 10 Tagen zeigten die Erythrocyten einen Anstieg, der aber nach 4 Wochen nicht mehr nachweisbar war. Ebenso waren die Monocyten vorübergehend vermehrt. Nach vier Wochen zeigten alle Granulocyten einen Anstieg. Bei den Lymphocyten fanden sich keine Unterschiede zu unbehandelten Tieren.

C.6.2.c. Vergleich der ersten Kontrolle nach 10 Tagen mit der zweiten nach vier Wochen

Im Laufe von vier Wochen stiegen nach Milzextraktbehandlung die Gesamtleukocyten an. Das Differentialblutbild zeigte jedoch einen sicheren Unterschied nur bei den Monocyten, die nach vier Wochen höher lagen als bei der ersten Kontrolle. Sie unterschieden sich aber in ihrer Höhe nicht vom Ausgangskollektiv.

Innerhalb der vier Wochen stiegen nach Kochsalzbehandlung die Erythrocyten, die Leukocyten insgesamt und dabei die eosinophilen Granulocyten, die Monocyten und die Lymphocyten besonders an.

C.6.2.d. Vergleich zwischen Milzextrakt- und Kochsalzbehandlung

Die beiden Kollektive vor der Behandlung waren voraussetzungsgemäß gleich und boten keine statistisch zu sichernden Unterschiede.

Bei der ersten Kontrolle fand sich bei den mit Milzextrakt behandelten Tieren eine signifikante Erhöhung der eosinophilen Granulocyten. Bei den übrigen Zellen ergaben sich keine Unterschiede.

Bei der zweiten Kontrolle vier Wochen nach der Behandlung ließen sich zwischen beiden Kollektiven

überhaupt keine Unterschiede nachweisen.

Tabelle 6.: Vergleich der verschiedenen Behandlungen bei C 58/J Mäusen
(Zweiseitige Fragestellung, 5% - Niveau.
ns = nicht signifikant)

	Ery	Leuko	St	Sg	Eo	Gr	Mo	Ly
unbeh. vs. Mex 10 d	+	ns	+	ns	+	+	ns	ns
unbeh. vs. Mex 28 d	ns	+	ns	+	+	+	ns	ns
unbeh. vs. NaCl 10 d	+	ns	ns	ns	ns	ns	+	ns
unbeh. vs. NaCl 28 d	ns	+	+	+	+	+	ns	ns
Mex 10 d vs. 28 d	ns	+	ns	ns	ns	ns	+	ns
NaCl 10 d vs. 28 d	+	+	ns	ns	+	ns	+	+
Mex vs. NaCl 10 d	ns	ns	ns	ns	+	ns	ns	ns
Mex vs. NaCl 28 d	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

C.7. Untersuchungen bei akuter lymphatischer Leukämie

C.7.1. Überlebenszeiten

Sechs Tage nach der Transplantation der malignen Zellen lebten von 60 Empfängertieren noch 56. Von ihnen erhielten 18 je 0,1ml physiologische Kochsalzlösung, weitere 38 Tiere bekamen 0,1ml Milzextrakt intraperitoneal.

Etwa vier Stunden nach der Injektion von Milzextrakt waren bereits über die Hälfte dieser Tiere gestorben. Im Laufe der folgenden Stunden starben weitere Mäuse, so daß nach 24 Stunden nur noch sieben Tiere am Leben waren. Drei von ihnen starben unter der Blutentnahme.

Alle Tiere, die Kochsalzlösung erhalten hatten, überlebten die ersten 48 Stunden nach der Injektion.

Die durchschnittlichen Überlebenszeiten nach der Injektion, d.h. vom sechsten Tag der Erkrankung an, betrugen bei Mäusen nach Kochsalzinjektion 4,5 Tage, bei den Tieren mit Milzextrakt 1,045 Tage. Die sieben Tiere, die nach Milzextrakt noch nach 24 Stunden am Leben waren, hatten allein gerechnet eine Überlebenszeit von 1,6 Tagen (harmonische Mittel).

C.7.2. Blutbilder (Abb. 13 u. S.122-125)

Das Differenzieren der Blutbilder gestaltete sich recht schwierig, da viele Zellen zerstört oder derart verändert, daß eine eindeutige Zuordnung unmöglich war.

Bei allen Tieren fiel das Fehlen der eosinophilen Granulocyten auf. Monocyten fanden sich nur vereinzelt. Die stabkernigen neutrophilen Granulocyten waren deutlich vermehrt. Bei den Tieren nach Kochsalzinjektion waren sie zwar prozentual nicht über die Norm erhöht. Absolut fanden sich jedoch höhere Werte auf Grund einer allgemeinen Zunahme der Zellzahlen.

Bei den Lymphocyten aller Tiere fielen zwei verschieden Populationen auf:

- die auch bei gesunden Tieren vorhandenen kleinen Lymphocyten mit pyknotischem Kern und schmalem, hellen Zytoplasmasaum mit vereinzelten Azurgranula;
- große Lymphocyten (ungefähr 20×10^{-6} m im Durchmesser) mit großem, grobscholligem Kern, rundlicher bis nierenförmiger Kerngestalt und tief basophilem Plasma, das keine Azurgranula, dafür aber verschiedentlich Vakuolen enthielt.

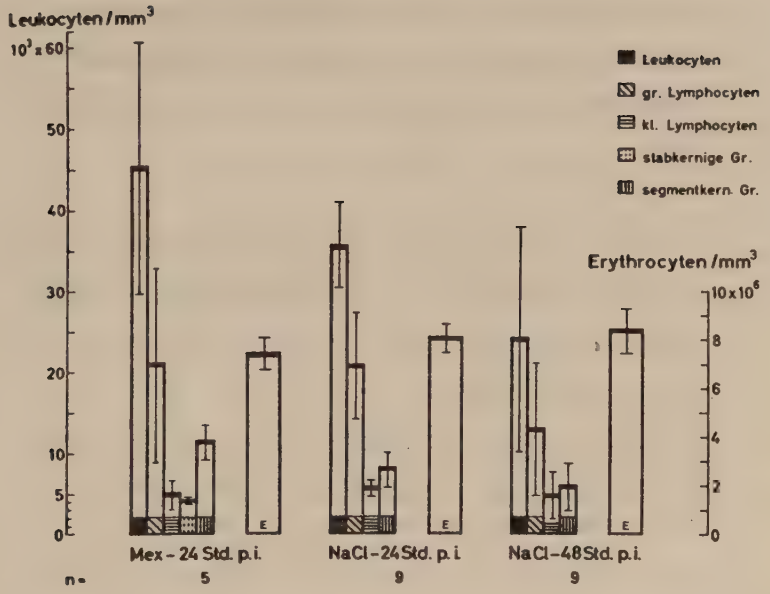


Abb. 13: Einfluß von Milzextrakt (Mex) und physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) auf das rote und weiße Blutbild bei C57Bl 6/J-Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie 24 und 48 Stunden nach Injektion. Eingezeichnet sind Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen (Werte s.Anhang), n = Anzahl der Tiere im jeweiligen Kollektiv.
E = Erythrocyten

Bei den Tieren mit Milzextrakt imponierten außerdem vermehrt Plasmazellen mit großem Zelleib, verhältnismäßig hellem Plasma und vielen Vakuolen. Daneben fanden sich Zelltrümmer und massenhaft lädierte Zellen, die nicht mehr zu identifizieren waren.

Auf Grund des geringen Stichprobenumfanges und der unverhältnismäßig großen Streuung können sichere Aussagen über Vergleiche zwischen den Kollektiven nicht gemacht werden.

Während zwischen den Erythrocyten der drei Gruppen (Tiere unter Milzextrakt nach 24 Stunden, Tiere unter Kochsalz nach 24 und 48 Stunden) keine Unterschiede zu bestehen schienen, lagen die Leukocytenwerte unter Milzextrakt wohl insgesamt etwas höher als unter Kochsalz. Nach 48 Stunden sanken die Leukocyten unter Kochsalz ab, so daß zwischen diesen beiden Gruppen ein statistisch bedeutsamer Unterschied bestand.

Ferner schienen unter Milzextrakt die Granulocyten stärker angestiegen zu sein als unter Kochsalzlösung.

Die nach den Ergebnissen bei den vorausgegangenen Versuchen zu erwartende Senkung der absoluten Lymphocytenzahlen trat weder bei den kleinen noch bei den großen Tumor-Lymphocyten ein.

D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Unsere Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Milzextrakte auf das weiße Blutbild der Maus haben im Wesentlichen gezeigt, daß

1) nach einmaliger Injektion die Anzahl der Leukocyten innerhalb der folgenden 24 Stunden absinkt, um dann wieder auf normale bis hochnormale Werte anzusteigen (Abb.1). Bei einer Reihe von Extrakten blieb jedoch der Abfall der Leukocytenzahlen aus (Abb. 8 - 10). In diesen Fällen war dann auch kein Anstieg der Zellzahlen zu beobachten.

Betrachtet man die einzelnen Zellgruppen innerhalb der Leukocyten, so kann man folgende Feststellungen treffen:

2) Nach einem kurzen initialen Abfall steigt die Zahl der Granulocyten an (Abb.2). Dabei sind vermehrt jugendliche Formen im peripheren Blut nachweisbar (Abb.3). Spätestens 48 Stunden nach der Injektion liegen die Zellzahlen wieder im Normbereich.

3) Die Lymphocyten hingegen zeigen einen starken Abfall. Die Verminderung der Zellzahlen hält, in Abhängigkeit vom jeweiligen Extrakt, bis zu 24 Stunden an (Abb. 4, 8 - 10).

4) Der Lymphocytenabfall ist von einer Verminderung der eosinophilen Granulocyten begleitet, wobei jedoch der Grad der Eosinopenie nicht mit der Lymphopenie parallel verläuft (Abb.6).

5) Bei den Monocyten finden sich sehr schnell nach der Injektion stark erniedrigte Werte. Dann folgt ein langsamer, kontinuierlicher Anstieg, der nach 72 Stunden den höchsten absoluten Wert erreicht (Abb.7).

Bei diesen Beobachtungen lassen sich somit in der Hauptsache zwei differente Wirkungen des Milzextraktes unterscheiden:

A) ein K u r z z e i t e f f e k t mit Senkung aller Zellzahlen und

B) ein L a n g z e i t e f f e k t mit Senkung der Lymphocyten und Erhöhung der Granulocyten.

Ähnliche Verhaltensmuster der Leukocyten finden sich nach Pyrifer-Injektionen beim Menschen, die zum ersten Mal 1945 MOESCHLIN (51) beschrieben hat.

MOESCHLIN's Leukocytenkurve wies kurz nach der Injektion einen Abfall auf, um dann auf Grund einer Vermehrung der stabkernigen und segmentkernigen neutrophilen Granulocyten anzusteigen. Der Gipfel der Kurve war nach zwei bis spätestens acht Stunden, ihr Ausgangswert nach 24 Stunden wieder erreicht. Der relative Granulocytenanstieg war - bei gesunden Probanden - abhängig von der Höhe des Ausgangswertes; d.h. bei höheren Werten vor der Injektion ist der relative Anstieg nur gering. Er bewegt sich beim Menschen zwischen 24% und 250% (36).

In etwa vergleichbare Leukocytenkurven erhielt STREICHER (63) nach Pyrifer-Injektion bei Ratten. Die individuellen Schwankungen waren jedoch erheblich; außerdem wurden die Untersuchungen von STREICHER an nur wenigen Tieren durchgeführt.

HARRIS und Mitarbeiter (34) fanden bei Meerschweinchen vier Stunden nach Injektion eines eiweißhaltigen Extrakts aus sterilem, entzündlichen Peritonealexsudat einen Anstieg der Granulocyten und Abfall der Lymphocyten im peripheren Blutbild. Gleichzeitige Knochenmarkuntersuchungen zeigten eine Abnahme der myeloischen Elemente bei Zunahme der Lymphocyten.

Auf der Suche nach Faktoren, die die Granulopoese beeinflussen, erzielte BIERMAN(11) mit salinischen Extrakten aus verschiedensten Geweben bei Ratten ebenfalls eine Granulocytose, neben einer Verminderung der Lymphocyten. Diese Granulocytose zeigte ihr Maximum zwischen drei und sechs Stunden nach der Injektion und erreichte dabei relative Anstiege bis zu 800%. Bei unseren eigenen Versuchen fanden wir lediglich Anstiege um 300%.

Überhaupt scheint die Injektion von Organextrakten Granulocytosen, verbunden mit Lymphopenien, hervorzurufen (48). Muskel- oder sogar Hirnextrakt zeigen ähnliche Aktivitäten (55). Wir selbst beobachteten nach Leberextrakt das gleiche Reaktionsmuster (Abb.8). Unterschiede fanden sich hingegen im Ausmaß der erreichten Veränderungen. Dies läßt sich aus unseren Resultaten nach Gabe von Lungen - oder Rattenmilzextrakt ableiten (Abb.8 und 9).

Physiologische und pathologische Zustände verschiedenster Art finden im peripheren Blutbild summarisch ihren Ausdruck. Mit einer verhältnismäßig begrenzten "Organsprache" werden endogene und exogene Reize in immer wiederkehrenden Bildern beantwortet. Deshalb versuchten verschiedene Arbeitsgruppen , die Veränderungen der zellulären Zusammen-

setzung des Blutes nach Applikation unterschiedlicher Substanzen zu differenzieren und Beziehungen zu bekannten endogenen Regulationsvorgängen aufzudecken.

So untersuchten KOMIYA und seine Schule (47,48) die Zusammenhänge zwischen Nervensystem und peripherem Blutbild. Es zeigte sich dabei eine Abhängigkeit der Zellzahl und Zellfunktion von der Intaktheit des peripheren Nervensystems. Sie ändern sich in charakteristischer Weise nach Durchtrennung des Rückenmarks, wobei der Ort der Läsion für die Veränderung von Bedeutung ist. Die Bildung sogenannter (Hämo-)Poetine in der Leber oder der Milz kann durch verschieden lokalisierte Verletzungen der Splanchnikusäste so verändert werden, daß auf einen Reiz hin (wie Injektion von Tusche, Typhusvakzine o.ä.) einmal ein sogenanntes Neutropoetin gebildet wird und ein anderes Mal ein anämisierender Stoff entsteht.

Die Unversehrtheit des endokrinen Systems scheint für die zelluläre Reaktion auf irgendwelche Reize hin ebenfalls bedeutsam zu sein. So kommt nämlich die nach Typhusvakzine übliche initiale Leukopenie bei hypophysektomierten oder adrenalektomierten Tieren nicht zustande (30).

Das Zusammenspiel von Hypophysen-Nebennierenrinden-System und Leukocyten untersuchten WESTPHAL und Mitarbeiter (75) genauer. Nach Injektion bakterieller Reizstoffe fanden sie im Blut bei Menschen und Tieren sowohl Leukocytosen als auch Leukopenien, immer aber eine Lymphopenie und meistens auch eine Granulocytose. Gleichzeitig nahm nach passagerem, kurzen Anstieg die Menge der freien Corticoide im Plasma ab. Auch nach wässrigen Lymphknoten- und Nierenextrakten kann man eine solche Abnahme des Plasmacortisols beobachten (57).

Zu gleichen hämatologischen und endokrinologischen Ergebnissen kamen auch KAISER und Mitarbeiter (20, 43 - 45) bei Anwendung von Milzextrakten. Für das Zustandekommen des Abfalls an Cortisol wird ein Mehrverbrauch im aktivierten RES diskutiert. Diese Aktivierung findet ihr morphologisches Korrelat in einer Monocytose und soll durch die im Milzextrakt vorhandenen Metaboliten, Nukleotide und Nukleoside, hervorgerufen werden.

SCHILLING (65), der ebenfalls ausführliche Untersuchungen über das Verhalten der Leukocyten durchgeführt hat, faßt seine Ergebnisse in der nach ihm benannten "Biologischen Leukocytenkurve" zusammen und vergleicht sie u.a. mit der Verhaltenskurve

der Leukocyten unter Stress, wie sie von SELYE (13,33) erarbeitet wurde. Zusammengefa3t findet man demnach (s.Abb.14):

- Kurz nach Einwirken der Noxe bzw. des Stressors einen Abfall der Gesamtleukocyten, wobei alle zellulären Bestandteile des Blutes absolut vermindert sind (Vorphase oder Alarmreaktion);
- ein bis zwei Stunden nach Einwirken des Stressors einen Anstieg der Leukocyten, basierend auf einer Steigerung der neutrophilen Granulocyten;
- im weiteren Verlauf ein Persistieren oder zusätzliches Absinken der Lymphocyten bei simultaner Verminderung der eosinophilen Granulocyten (die Kampfphase nach SCHILLING oder die Resistenzphase nach SELYE);
- einer Renormalisierung entsprechend nach Stunden oder Tagen ein Absinken der erhöhten Gesamtleukocyten mit kurzfristigem, passageren Anstieg der Monocyten, sowie Anstieg der Lymphocyten und eosinophilen Granulocyten (Heilphase von SCHILLING, Ermüdungsphase von SELYE).

Da als Stressoren vielerlei Einwirkungen in Frage kommen, mu3ten wir vorläufig annehmen, da3 unsere Ergebnisse nicht unbedingt eine spezifische Wirkung der Milz - etwa über einen Milz-"Faktor" -, sondern das typische Verhaltensmuster auf unspezifische Reize widerspiegeln.

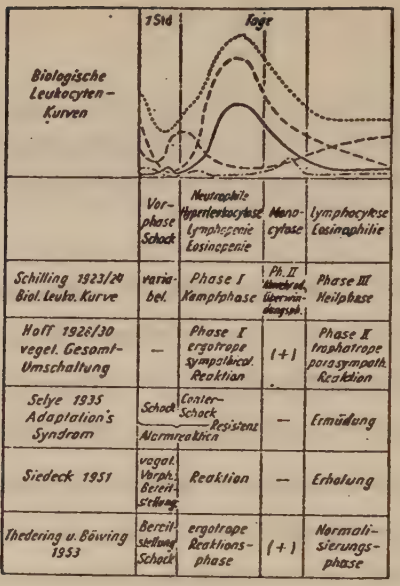


Abb. 14:"Vergleich der Leukocytenkurven nach SCHILLING (Biol.L K.), nach HOFF (vegetative Gesamtumschaltung), nach SELYE (Adaptationssyndrom), nach SIEDECK, THEDERING und BÖWING. Die Grundlage bildet bei allen neueren Untersuchungen die Biol.-Leuk.-Kurve."
(Aus : V. Schilling, Die Regulierung des morphologischen Blutbildes. Proc.5th Congr. Europ.Soc.Haemat. Freiburg 1955. Springer Verlag 1956, Seite 203.)

..... Leukocyten
– – – Granulocyten
— — Lymphocyten
–·–·– eosinophile
——— Kernverschiebungs-Index

Für die Annahme einer unspezifischen Wirkung sprechen einmal die bereits erwähnte Tatsache, daß ähnliche Effekte auch mit Extrakten aus ganz anderen Organen erzielt werden können, zum anderen die für den Stress typische initiale rasche Verminderung aller Zellelemente (65) und nicht zuletzt auch unsere Untersuchungsergebnisse bei Mäusen mit akuter lymphatischer Leukämie.

Bei diesen Versuchen starben etwa 50% der Tiere innerhalb der ersten vier Stunden nach der Injektion des Extraktes. Das entspricht dem Zeitraum, in dem die Stimulierung der Nebennierenrinde ihr Maximum erreicht. Als Zeichen einer vermehrten Hormonausschüttung waren bei der Blutentnahme 24 Stunden p.i. immer noch keine eosinophilen Granulocyten im Differentialblutbild nachweisbar.

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine unspezifische Wirkung besteht schließlich auch noch in der Verwandschaft zwischen den von uns und den von WESTPHAL (75) angewendeten Substanzen. WESTPHAL erzielte seine Wirkungen mit niedermolekularen Stoffen, dialysablen Spaltprodukten von Polysacchariden aus E.coli, mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 3000. Diese von WESTPHAL dargestellten Substanzen, die nach einer charakteristischen Eigenschaft

Pyrogene genannt werden, vermögen die Freisetzung von ACTH zu bewirken(78) und führen damit natürlich wiederum zum Stress. Es erscheint sehr wohl möglich, daß in unseren Extrakten, die zwar bakteriologisch steril, aber unter unsterilen Bedingungen hergestellt worden waren, ähnliche Stoffe enthalten waren, zumal ja auch der Molekulargewichtsbereich bei uns in einer ähnlichen Größenordnung lag.

Trotz dieser eben diskutierten möglichen unspezifischen Effekte unserer Milzextrakte, glauben wir auf Grund der folgenden Tatsachen zur Annahme zusätzlicher spezifischer Wirkungen dieser Extrakte berechtigt zu sein.

1.- Innerhalb der ersten Stunde nach der Injektion ist eine stärkere Zellverminderung nach Milzextrakt zu beobachten, verglichen mit den Kochsalzkontrollen.

2.- Die zwischenzeitliche Erhöhung der eosinophilen Granulocyten ist mit einer massiven Corticoid-Ausschüttung unter Stress-Bedingungen nicht zu vereinbaren (Abb.7).

3.- Der Anstieg der stab- und segmentkernigen Granulocyten nach acht Stunden erfolgt simultan und nicht sukzessiv, wie dies nach Kochsalz der Fall ist.

4.- Die Abfolge der Kurvenbewegungen, besonders

die der Granulocyten, zeigt nach Milzextrakt einen von den Kochsalz-Kontrollen differenten Ablauf entlang der Zeitachse. Die Granulocytose nach Milzextrakt findet sich z.B. bereits nach acht Stunden, während sie nach Kochsalzlösung erst nach 48 Stunden auftritt (Abb.2)

5.- Die primäre Senkung der Stress-Lymphocyten, deren Kontrolle ja extraadrenalen Mechanismen unterliegt (21), und ihre sekundäre Zunahme ist nach Milzextrakt stärker ausgeprägt, als nach Kochsalz-Injektion (Abb.5).

6.- Die langanhaltende (d.h. mehr als 24 Stunden) und kräftige Senkung der Lymphocyten nach Milzextrakt ist nach Kochsalz nicht oder nur kaum zu beobachten (Abb.4). Eine Nebennierenhormon-induzierte Lymphopenie ist zudem meist schon 24 Stunden p.i. normalisiert (77).

7.- Unter Milzextrakt resultiert die Leukopenie aus einer Lymphopenie. Beim Stress findet man zum gleichen Zeitpunkt hingegen eine Leukocytose.

8.- Schließlich zeigt sich besonders nach säulenchromatographischer Trennung des Milzextrakts, daß die Veränderungen nach Vollmilzextrakt die Resultante verschiedener Einzelwirkungen darstellen und somit nicht unter dem einfachen

Nenner eines "unspezifischen Reizes" subsummiert werden dürfen.

Auf welche Weise die beobachteten Veränderungen nach Milzextrakt zustande kommen, ist weitgehend ungeklärt. Für die Zunahme der Granulocyten in der Peripherie mag die gleichzeitige Entleerung des Knochenmarks von myeloischen Zellen ursächlich bedeutsam sein (34). Der Anteil der membranunreifen Granulocyten im Blut nimmt nach den Ergebnissen von GOSTOMZYK (31,32) jedenfalls zu. Daß die Ursache der Lymphopenie nicht in einer Ansammlung dieser Zellen am Orte der primären Reizeinwirkung, d.h. in der Bauchhöhle, zu suchen ist, wiesen SPEIRS und Mitarbeiter nach (67). Zellverschiebungen vom intra- in den extravasalen Pool, also etwa in die Muskulatur (35) oder sogar ins Knochenmark (34) erscheinen möglich.

Ein direkter Eingriff in den Stoffwechsel der Zelle, wie er vom "Lienin" GERLICH's (29) und von dem Extrakt aus aktivierten Kälbermilzen nachgewiesen ist (1-5), erscheint uns bei der Interpretation unserer Ergebnisse weniger in Betracht zu kommen. Wir beobachteten unsere Effekte zu einem Zeitpunkt, zu dem unter Berücksichtigung der Lebensspanne der Zellen diese Mechanismen noch nicht wirksam sein können. Für eine direkte Beeinflussung der Lymphocyten fand sich auch bei späteren in-vitro Versuchen in unserem Labor ebenfalls kein Anhalt. Ferner ergaben sich bei

unseren Versuchen mit wiederholter Milzextraktgabe und längeren Beobacntungszeiten keine Hinweise auf eine zellgericntete Beeinflussung.

Über die chemische Natur der von uns gefundenen leukocytenaktiven Substanzen, bei denen es sich vermutlich um Polypeptide handelt, können wir bisher folgende Aussagen machen:

1) Die Stoffe sind wasserlöslich und dialysabel.
2) Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 1000 und 5000.
3) Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 220 nm.
4) Es bestent eine relative Hitzelabilität insofern, als durch Temperaturerhöhung auf 80°C bei der Herstellung der Extrakte die Wirkung abgeschwächt, aber nicht aufgehoben wird.

Ob den von uns nachgewiesenen Wirkungsprinzipien im fraktionierten Milzextrakt eine physiologische Rolle in der Regulation der korpuskulären Blutbestandteile zufällt, können wir noch nicht entscheiden. Auch die Antwort auf die Frage, in welchem Ausmaß und unter welchen Bedingungen diese Stoffe in vivo von der Milz an das Blut abgegeben werden und vor allem, inwieweit sie mit den eingangs postulierten "Milzfaktoren" identisch sind, muß weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

Es gibt eine Reihe von Funktionen der Milz, die als bereits gesichertes Wissen gelten können, wie z.B. die fetale Erythropoese, die Lymphopoese, der Abbau von Erythrocyten u.a. Daneben gibt es Auswirkungen der Milz auf den Organismus, denen ein gewisser Grad an Wahrscheinlichkeit zugebilligt wird, wie z.B. eine carcinostatische oder eine digitalisähnliche Aktivität etc. Verschiedene andere Milzeffekte müssen dagegen noch als hypothetisch charakterisiert werden und bedürfen der weiteren experimentellen Absicherung. Hierher gehört vor allem das Problem einer humoralen Steuerung der zellulären Zusammensetzung des peripheren Blubildes durch die Milz. Wir haben daher versucht, mit der vorliegenden Arbeit einen weiteren experimentellen Beitrag zur Klärung dieser Problematik zu leisten.

Wir haben hierfür einen wässrigen, eiweißfreien Extrakt aus Kälbermilzen entwickelt und säulenchromatographisch in verschiedene Fraktionen aufgetrennt. Die wirksamen Bestandteile erwiesen sich als dialysabel und hitzelabil. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 1000 und 5000.

Die intraperitoneale Injektion solcher Extrakte hatte bei gesunden Versuchstieren Wirkungen, die klar in

A) K u r z z e i t e f f e k t e und

B) L a n g z e i t e f f e k t e

aufgeschlüsselt werden konnten. Der Kurzzeiteffekt, der innerhalb von einer Stunde post injectionem zu beobachten ist, ist durch eine Verminderung aller weißen Zellen im peripheren Blut gekennzeichnet.
Der Langzeiteffekt ist aus verschiedenen Einzelwirkungen zusammengesetzt. Es sind dies im wesentlichen:

1.) Eine bis zu 24 Stunden p.i. anhaltende Leukopenie.
2.) Eine ausgeprägte, länger als 24 Stunden anhaltende Lymphopenie.
3.) Eine mäßige, simultane Vermehrung von stab- und segmentkernigen neutrophilen Granulocyten.
4.) Eine passagere Erhöhung der eosinophilen Granulocyten vier Stunden nach der Extraktinjektion.
5.) Ein träger allmählicher Anstieg der Monocyten.

Nach säulenchromatographischer Trennung des Milzextraktes zeigten die einzelnen (vier) Fraktionen A,B,C und D unterschiedliche Auswirkungen auf den Kernverschiebungs-Index und auf den Lymphocyten-Index.
Schließlich wurden die typischen Veränderungen der Leukocyten unter dem Einfluß unseres Milzextraktes mit ähnlichen Leukocyten-Verhaltensmustern verglichen,

die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (z.B. Stress-Bedingungen) von anderen Autoren beobachtet worden waren.

Bei den Versuchen mit (akut und chronisch) leukämischen Mäusen ergaben sich Befunde, die nicht ohne weiteres zu interpretieren waren, möglicherweise aber auf Grund weiterer Untersuchungen interpretierbar werden.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis hervorzuheben, daß wässrige, eiweißfreie Milzextrakte spezifische Effekte auf die zelluläre Zusammensetzung des peripheren Blutes haben. Auf Grund der bisherigen Ergebnisse kann man vermuten, daß die erwähnten spezifischen Effekte nicht durch eine Substanz allein ausgelöst werden.

Alle Resultate wurden mit adäquaten statistischen Methoden eingehend überprüft.

F. T A B E L L A R I S C H E R A N H A N G

(Absolute Häufigkeiten mit Verteilungen und statistischen Kennzahlen)

Erläuterungen zu den Abbildungen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Kollektive.
Auf der Ordinate sind die absoluten Häufigkeiten aufgetragen, auf der Abszisse die Klassengrenzen.
Die Klassengrenzen sind angegeben

- bei den Erythrocyten in Millionen,
- bei den Leukocyten, Granulocyten und Lymphocyten in Tausend,
- bei eosinophilen Granulocyten und Monocyten in Hundert.

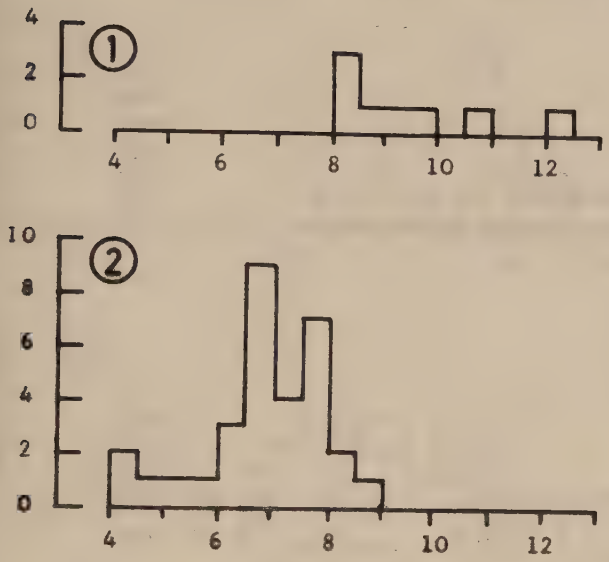
Die Zahlen am rechten Bildrand neben jedem Kollektiv bedeuten von oben nach unten gelesen:

Anzahl der Tiere im Kollektiv	z.B. 8,00
Mittelwert	9,40
Medianwert (in Klammern)	(8,99)
Standardabweichung des Mittelwerts	0,52
Standardabweichung	1,48
Variationskoeffizient	15

Sogenannte Ausreißer, d.h. Werte, die vermutlich aus einer anderen Grundgesamtheit als die Stichprobe stammen, wurden durch einen Schrägstrich gekennzeichnet. Die Kennwerte der Stichproben wurden jeweils mit und ohne den Ausreißer berechnet.

① N-Ratten ② MC-Ratten

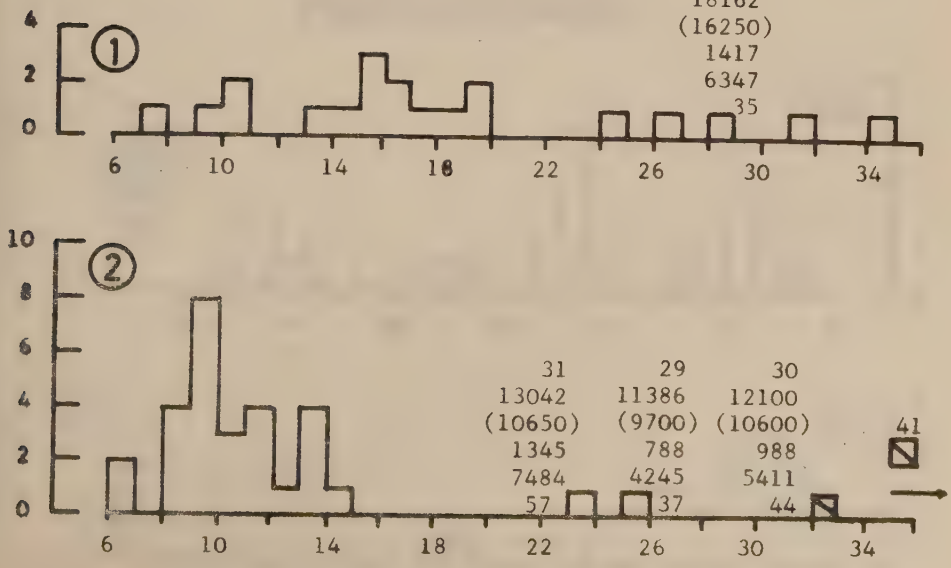
ERYTHROCYTEN



8
9.40
(8.99)
0.52
1.48
15

31
6.86
(6.96)
0.18
1.04
15

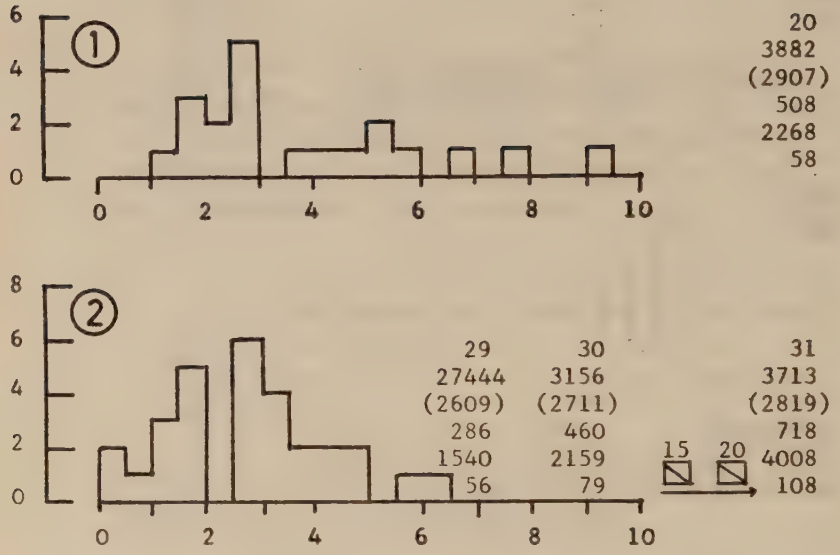
LEUKOCYTEN



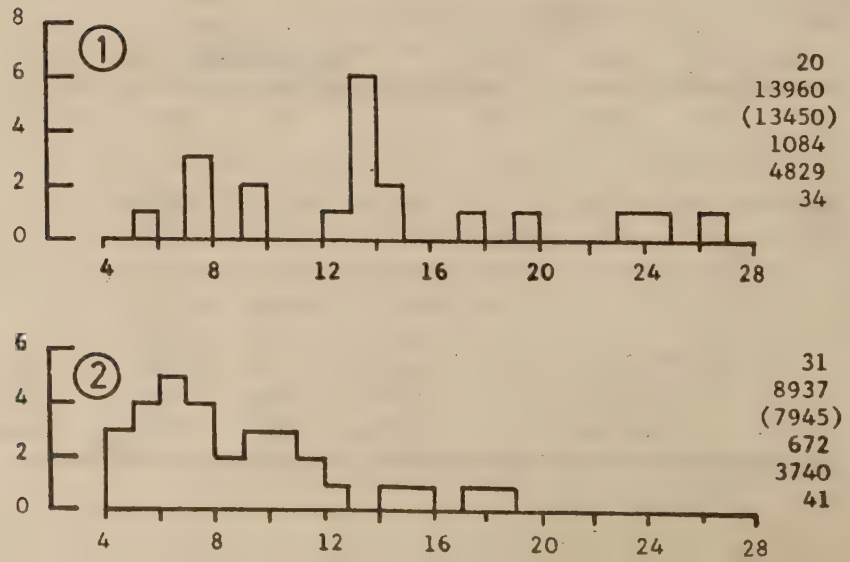
20
18162
(16250)
1417
6347
35

① N - Ratten ② MC - Ratten

GRANULOCYTEN

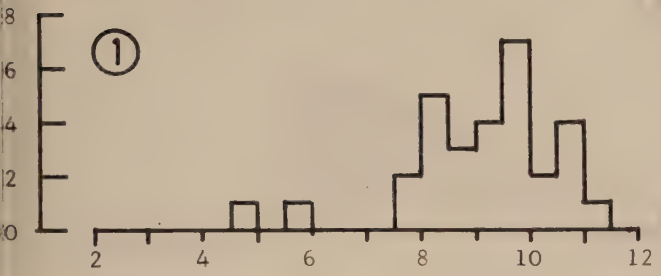


LYMPHOCYTEN

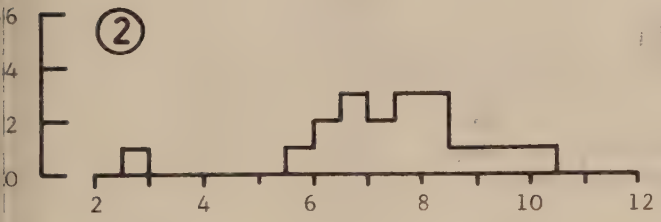


① N - Mäuse ② MC - Mäuse

ERYTHROCYTEN

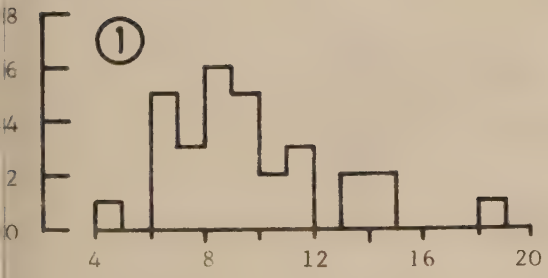


30,00
9,13
(9,36)
0,17
0,95
10

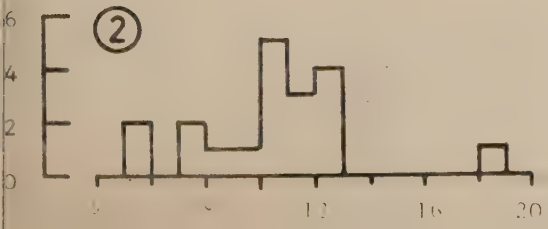


19,00
7,44
(7,56)
0,34
1,48
20

LEUKOCYTEN

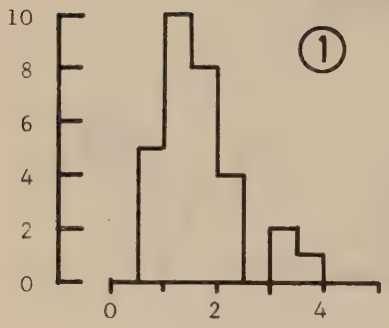


30
9620
(9150)
435
2383
24

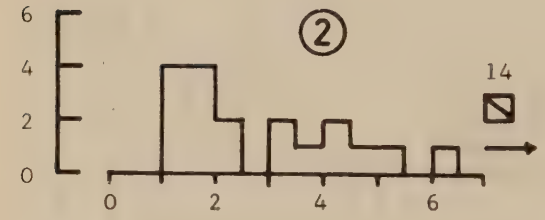


19
10565
(10500)
673
2938
27

GRANULOCYTEN

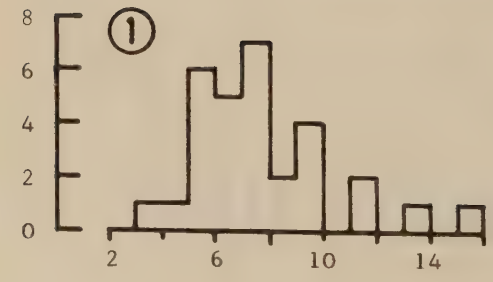


30
1674
(1523)
138
758
45

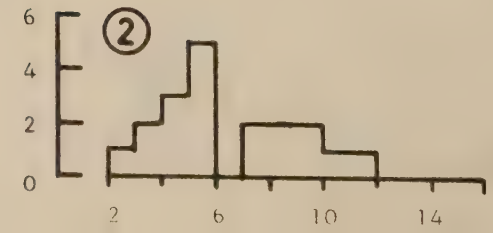


18	19
2860	3475
(2317)	(2320)
370	712
1606	3107
56	89

LYMPHOCYTEN



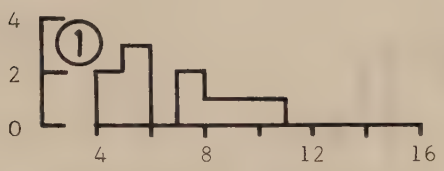
30
7742
(7310)
397
2177
28



19
6395
(5240)
534
2322
36

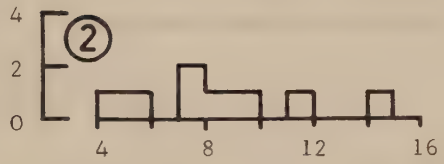
LEUKOCYTEN

① Mex ② NaCl



10
6860
(6480)
656
2075
30

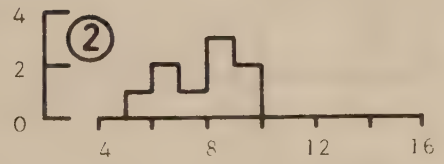
1 Std. p.i.



8
8618
(8025)
1050
3012
35

8
4281
(4050)
310
877
20

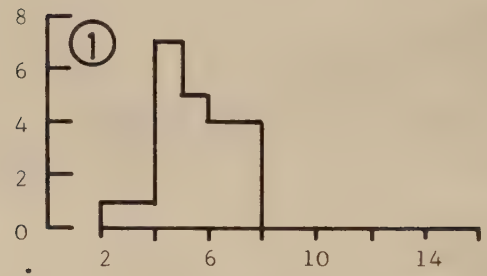
2 Std. p.i.



9
7755
(8100)
502
1505
19

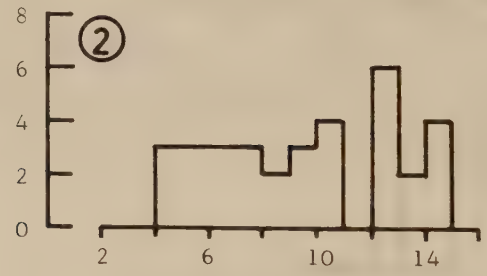
LEUKOCYTEN

① Mex ② NaCl

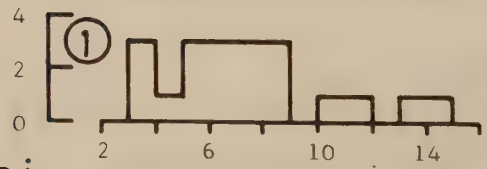


22
5490
(5725)
292
1374
25

4 Std. p.i.

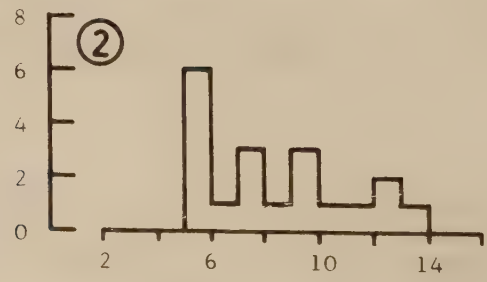


33
9695
(9750)
512
2943
30



20
5426
(7200)
481
2155
39

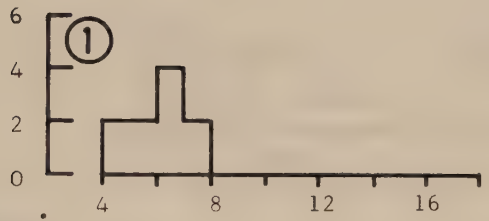
8 Std. p.i.



19
8336
(7950)
553
2412
29

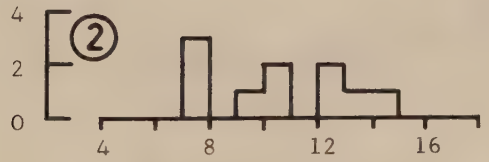
LEUKOCYTEN

① Mex ② NaCl

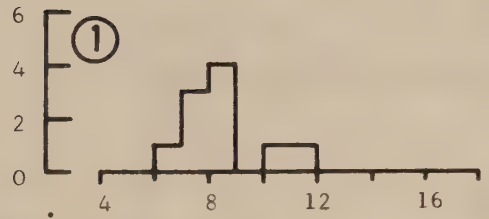


10
6085
(6075)
361
1142
18

24 Std. p.i.

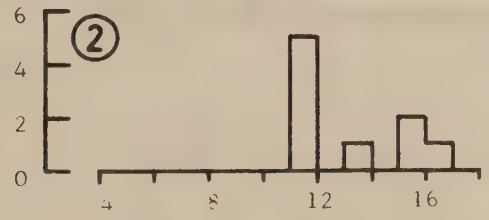


10
10540
(10525)
806
2549
24



10
8590
(8250)
389
1231
14

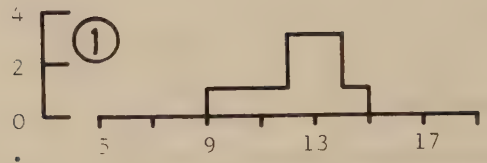
48 Std. p.i.



9
13111
(11650)
687
2061
15

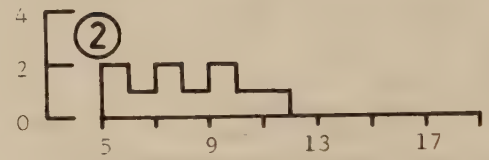
LEUKOCYTEN

① Mex ② NaCl

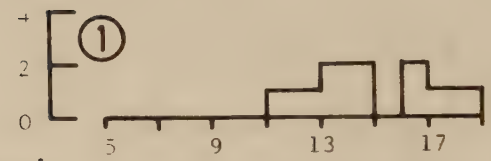


10
12365
(12800)
466
1476
12

72 Std.p.i.

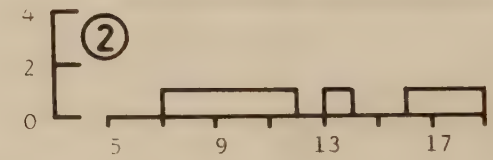


10
8280
(8250)
638
2020
15



10
14905
(14600)
723
2288
15

96 Std.p.i.



9
12561
(11800)
1362
4088
32

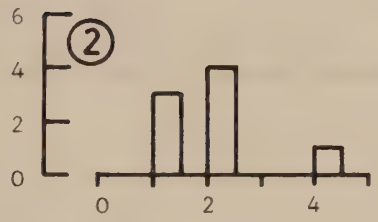
GRANULOCYTEN

① Mex

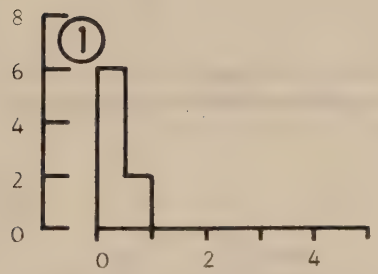
② NaCl

10
538
(520)
97
309
57

1 Std. p.i.

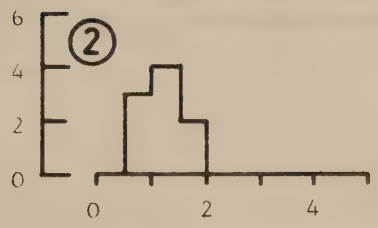


8
2115
(2168)
376
1065
50



8
419
(394)
104
295
70

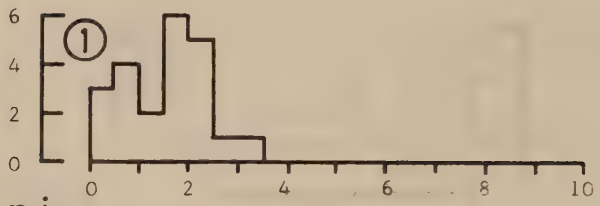
2 Std. p.i.



9
1115
(1046)
118
355
31

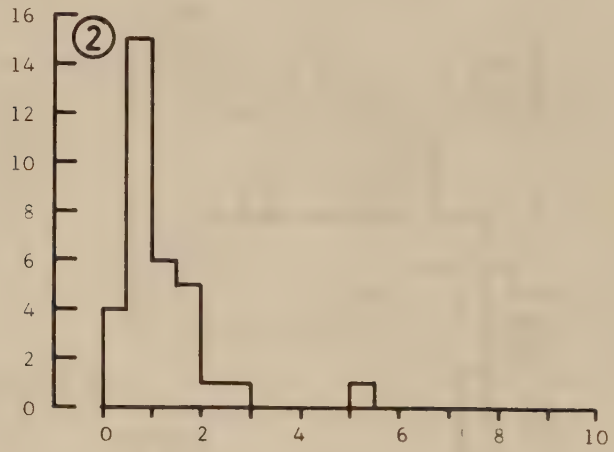
GRANULOCYTEN

① Mex ② NaCl

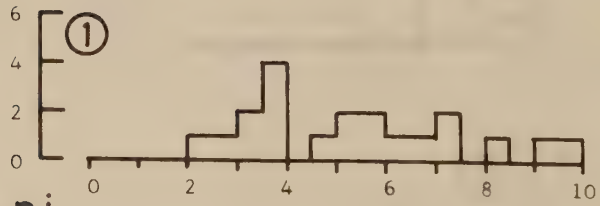


22
1546
(1575)
158
743
48

4 Std. p.i.

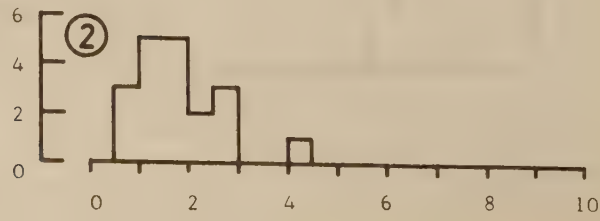


33
1189
(931)
141
813
68



20
5426
(5480)
481
2155
39

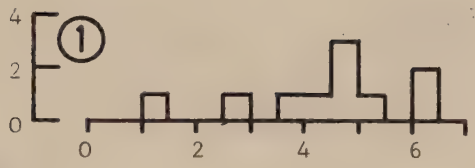
8 Std. p.i.



19
1791
(1572)
177
773
43

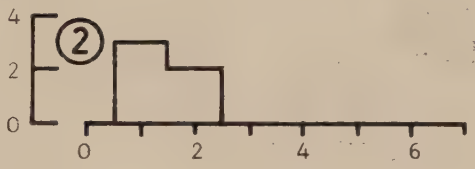
GRANULOCYTEN

① Mex ② NaCl

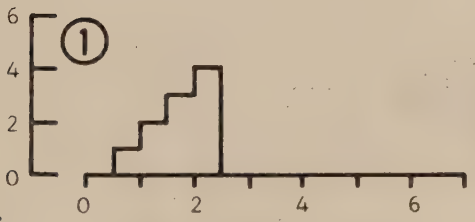


10
4419
(4613)
488
1546
35

24 Std.p.i.

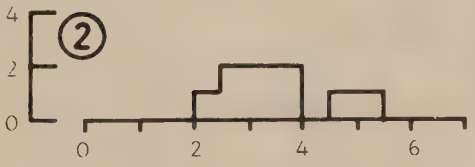


10
1411
(1378)
181
574
40



10
1841
(1534)
268
849
46

48 Std. p.i.

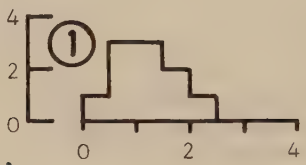


9
3516
(3480)
321
963
27

GRANULOCYTEN

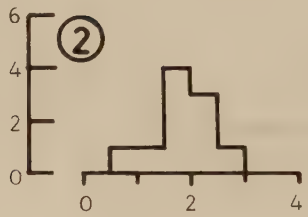
① Mex

② NaCl

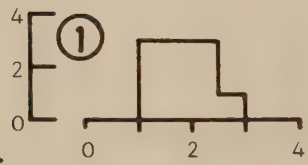


10
1157
(1123)
195
618
53

72 Std. p.i.

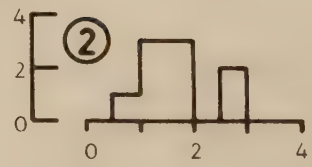


10
1823
(1758)
180
568
31



10
1970
(1937)
137
435
22

96 Std. p.i.

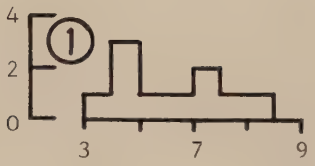


9
1712
(1757)
225
677
39

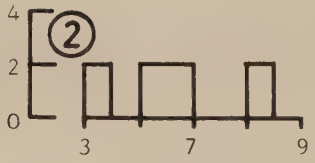
LYMPHOCYTEN

① Mex ② NaCl

1 Std. p.i.

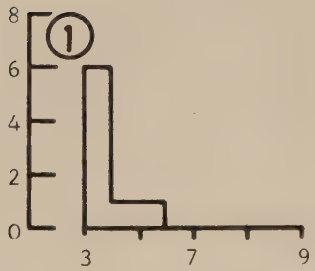


10
6311
(5951)
637
2016
32

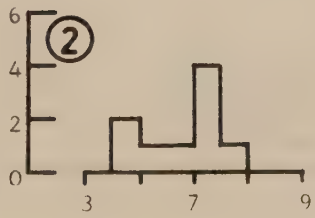


8
6399
(6386)
853
2415
37

2 Std. p.i.



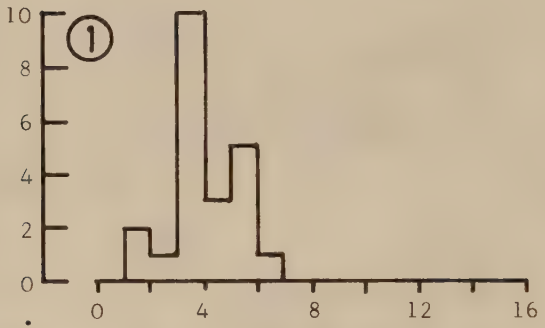
8
3861
(3696)
256
725
18



9
6603
(7047)
454
1363
20

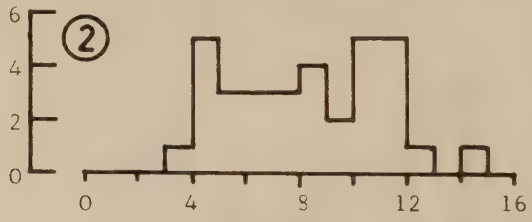
LYMPHOCYTEN

① Mex ② NaCl

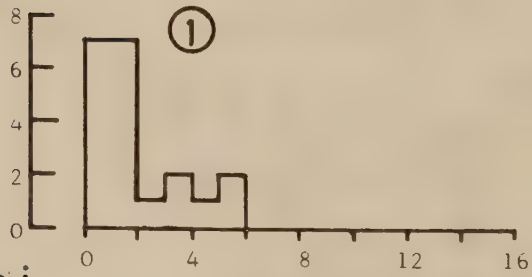


22
3877
(3789)
254
1194
30

4 Std. p.i.

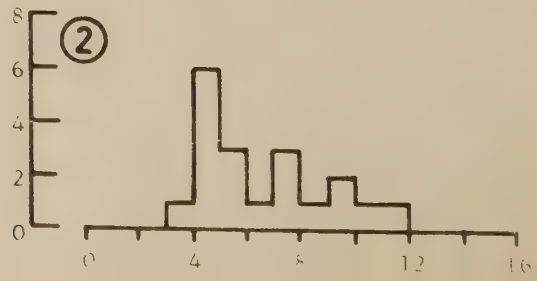


33
8355
(8531)
438
2518
30



20
1955
(1245)
67
304
15

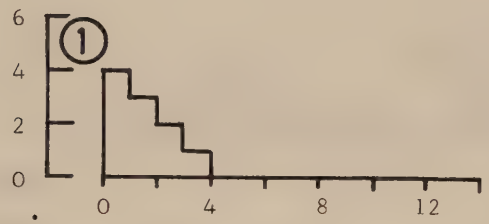
8 Std. p.i.



19
6544
(5724)
480
2190
32

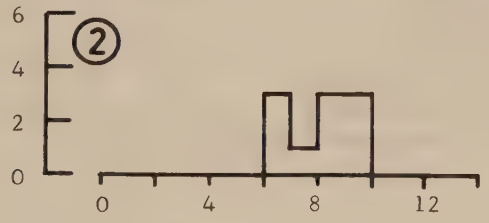
LYMPHOCYTEN

① Mex ② NaCl

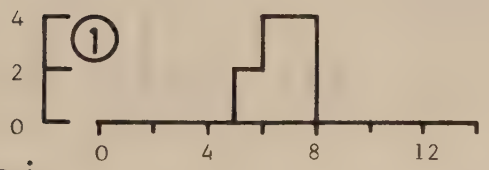


10
1557
(1270)
297
941
60

24 Std. p.i.

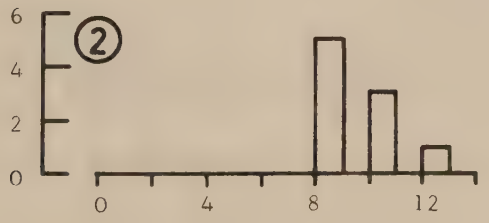


10
9045
(9522)
786
2485
27



10
6607
(6538)
256
910
12

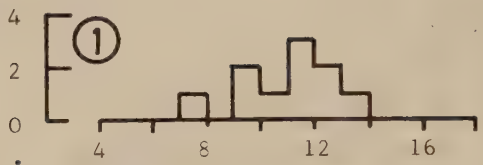
48 Std. p.i.



9
9538
(8950)
475
1425
15

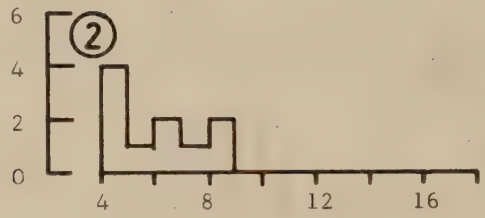
LYMPHOCYTEN

① Mex ② NaCl

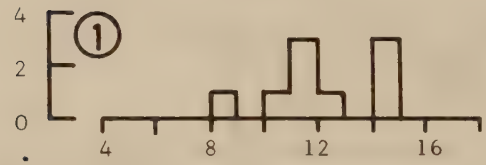


10
10856
(11500)
574
1817
16

72 Std. p.i.

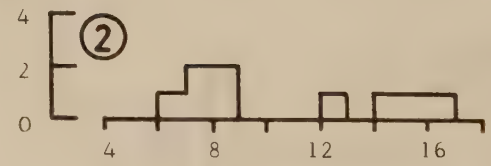


10
6411
(6022)
617
1952
30



10
12708
(12291)
728
2303
18

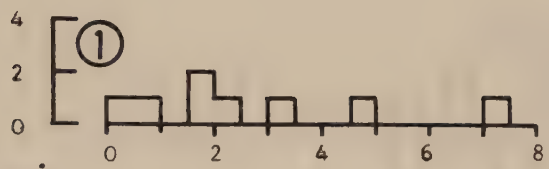
96 Std. p.i.



9
10766
(8909)
1297
3891
36

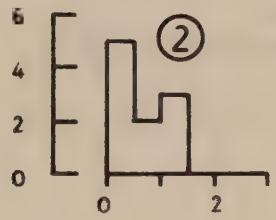
EOSINOPHILE

② Mex ① NaCl

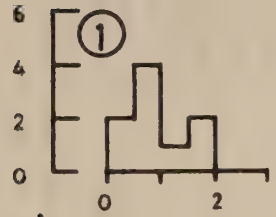


8
271
(207)
79
223
82

1 Std. p.i.

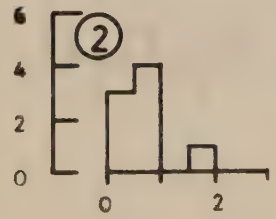


10
61
(42)
15
49
80



9
95
(92)
19
59
62

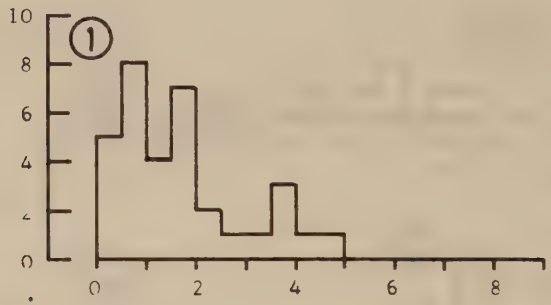
2 Std. p.i.



8
66
(65)
16
45
69

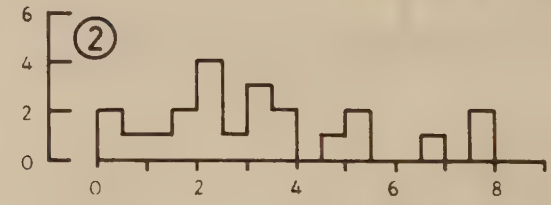
EOSINOPHILE

② Mex ① NaCl

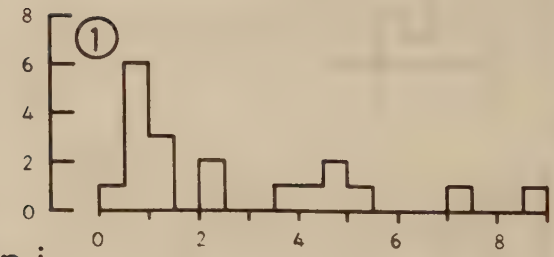


33
164
(142)
20
116
70

4 Std. p.i.

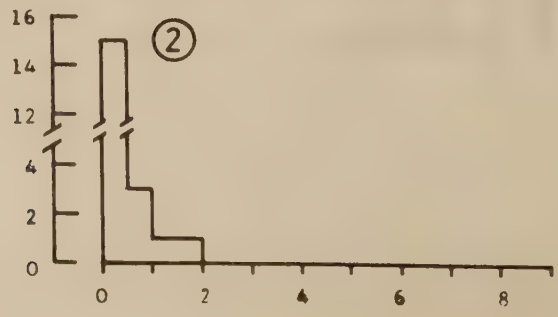


22
323
(292)
47
222
68



19
267
(112)
49
214
80

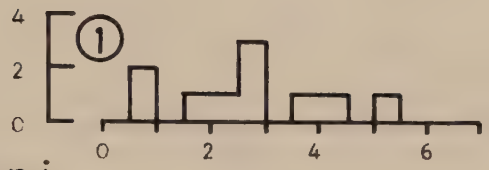
8 Std. p.i.



20
30
(00)
9
44
146

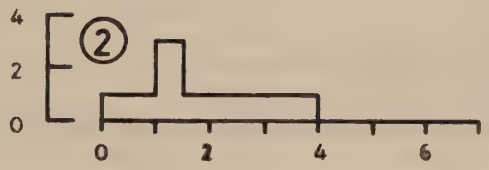
EOSINOPHILE

② Mex ① NaCl

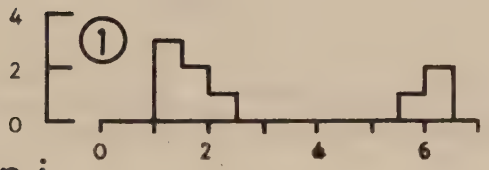


10
260
(266)
46
146
56

24 Std. p.i.

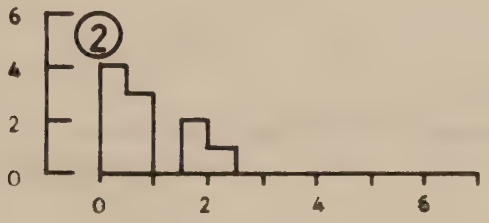


10
119
(152)
36
113
59



9
316
(172)
76
277
87

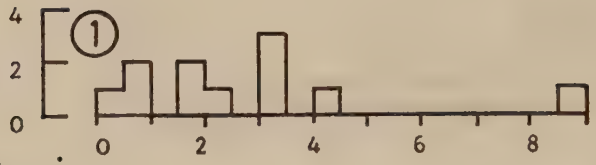
48 Std. p.i.



10
91
(68)
24
78
85

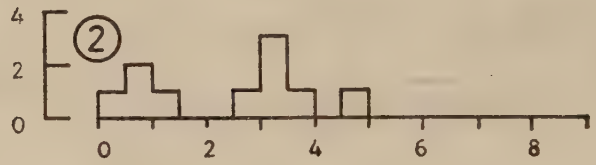
EOSINOPHILE

② Mex ① NaCl

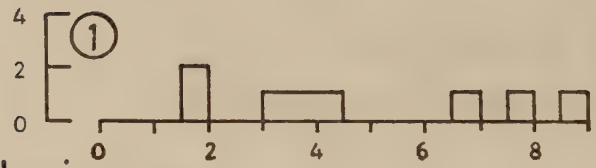


10
275
(211)
77
245
89

72 Std. p.i.

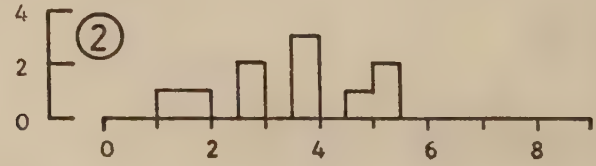


10
241
(312)
52
165
89



9
537
(407)
115
346
64

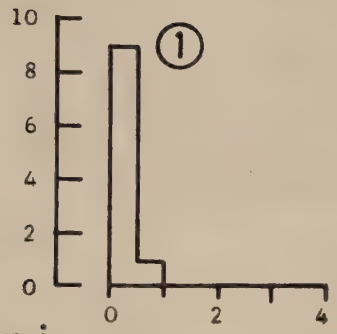
96 Std. p.i.



10
341
(360)
42
133
42

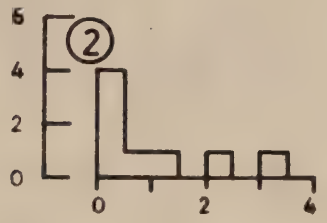
MONOCYTEN

① Mex ② NaCl

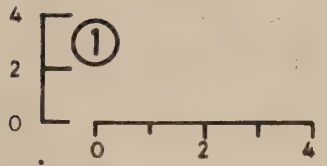


10
10
(0)
5
18
180

1 Std. p.i.

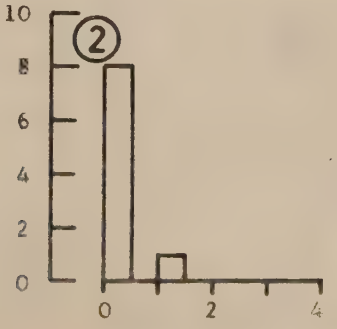


8
103
(63)
42
119
115



8
0
0
0
0

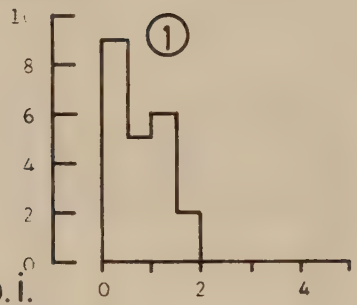
2 Std. p.i.



9
36
(31)
13
40
111

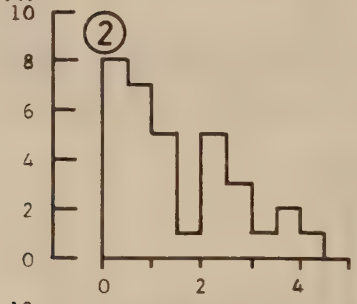
MONOCYTEN

① Mex ② NaCl

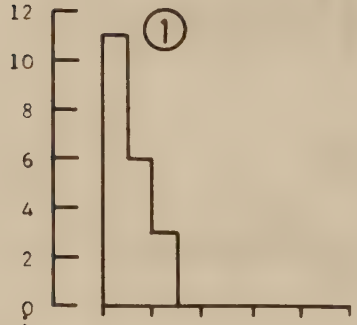


22
66
(65)
12
59
89

4 Std. p.i.

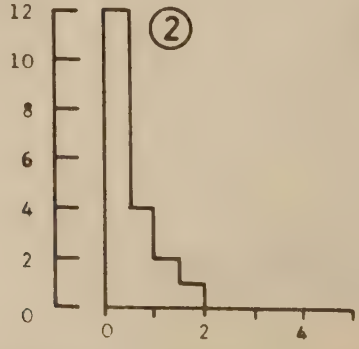


33
155
(120)
20
116
74



20
53
(42)
8
40
75

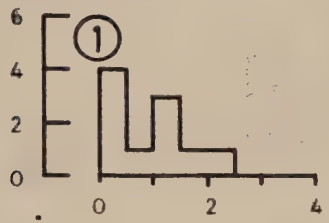
8 Std. p.i.



19
50
(39)
9
41
82

MONOCYTEN

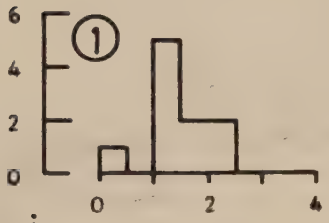
① Mex ② NaCl



10
98
(96)
24
75
76

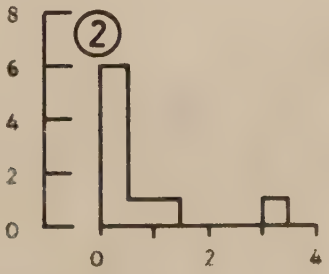
24 Std. p.i.

10
83
(56)
21
67
81



10
141
(119)
19
57
41

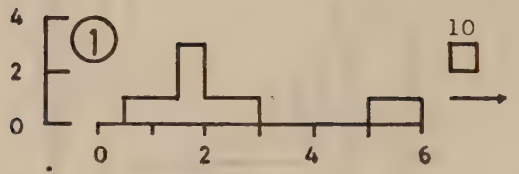
48 Std. p.i.



9
56
(0)
35
105
187

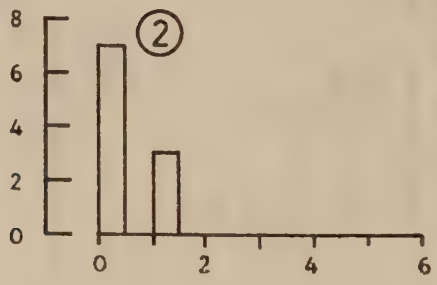
MONOCYTEN

① Mex ② NaCl

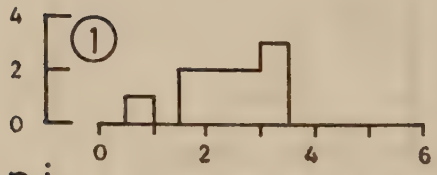


10
350
(200)
86
272
77

72 Std.p.i.

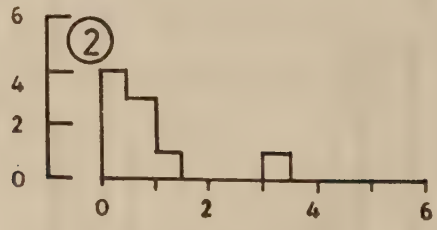


10
45
(14)
18
58
129



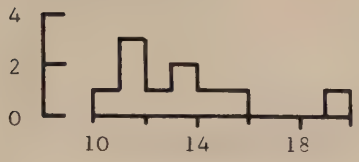
10
236
(237)
27
86
36

96 Std.p.i.

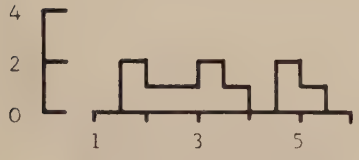


9
81
(84)
32
98
121

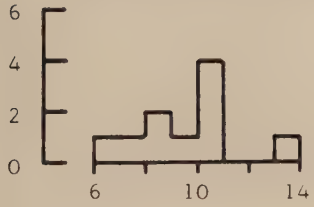
OH I — **4 Std. p.i.**



10
13505
(13250)
858
2713
20 **LEUKOCYTEN**

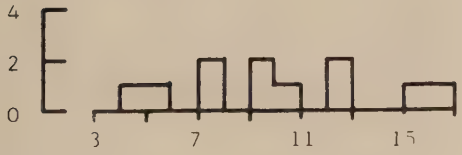


10
3435
(3375)
404
1278
37 **GRANULOCYTEN**

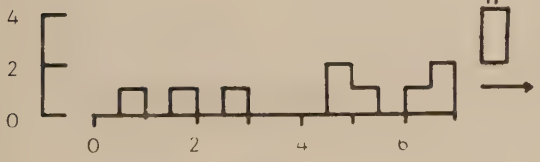


10
9646
(9707)
630
1900
20 **LYMPHOCYTEN**

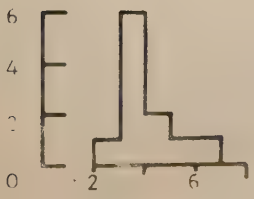
OH II



11
9813
(9350)
1134
3762
38 **LEUKO.**



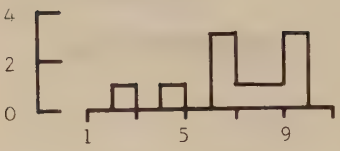
11
5724
(5163)
1060
3516
61 **GRAN.**



11
4127
(3932)
347
1153
28 **LYMPHOCYTEN**

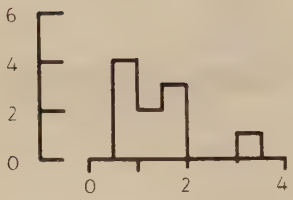
4 Std. p.i.

Ko



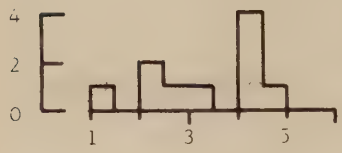
10
7045
(7250)
712
2252
32

LEUKOCYTEN



10
1286
(1780)
237
750
58

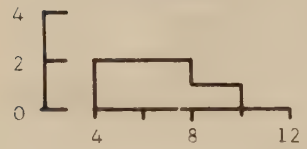
GRANULOCYTEN



10
5737
(6246)
695
2200
38

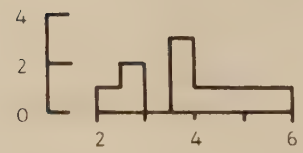
LYMPHOCYTEN

Leber



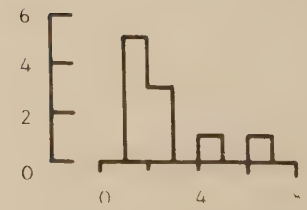
10
6755
(6600)
561
1775
26

LEUKOCYTEN



10
3855
(3736)
363
1148
29

GRANULOCYTEN

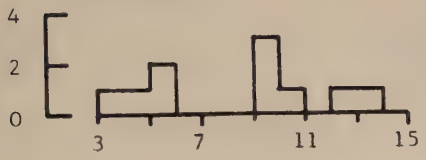


10
2733
(2230)
517
1636
59

LYMPHOCYTEN

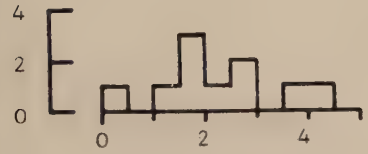
NH_4Cl

24 Std p.i.



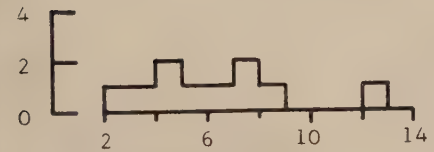
10
8375
(9300)
1104
3493
41

LEUKOCYTEN



10
2134
(1818)
370
1170
54

GRANULOC.



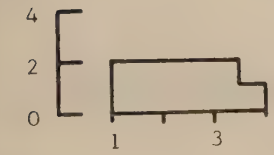
10
6091
(6013)
913
2889
47

LYMPHOCYTEN

Lunge

11
11309
(11550)
918
3045
27

LEUKOCYTEN



11
2381
(2415)
241
801
33

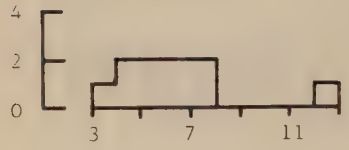
GRANULOC.

11
8751
(8740)
809
2685
30

LYMPHOCYTEN

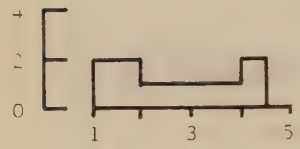
24 Std. p.i.

80°



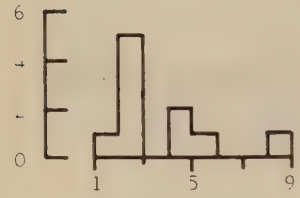
10
6505
(6025)
765
2420
37

LEUKOCYTEN



10
2680
(2501)
387
1224
45

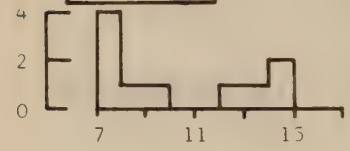
GRANULOCYTEN



10
3726
(2643)
682
2158
58

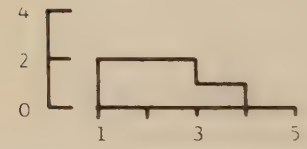
LYMPHOCYTEN

$CHCl_3$



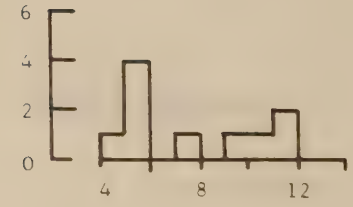
10
10215
(8925)
972
3074
30

LEUKOCYTEN



10
2269
(2091)
281
890
39

GRANULOCYTEN



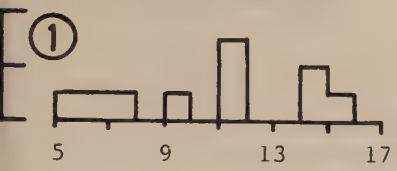
10
7743
(6639)
886
2802
36

LYMPHOCYTEN

① N - Ra

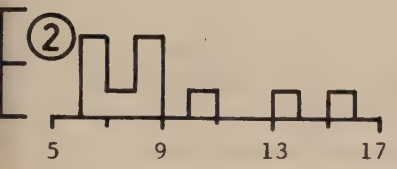
② MC - Ra

24 Std. p.i.

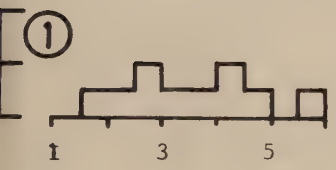


10
10810
(11550)
1132
3579
33

LEUKOCYTEN

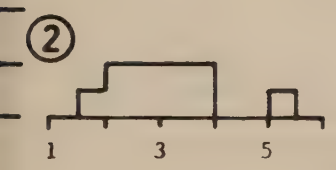


10
9300
(8150)
979
3097
33

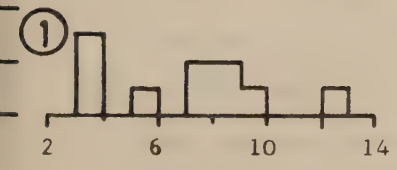


10
3479
(3510)
371
1174
33

GRANULOCYTEN

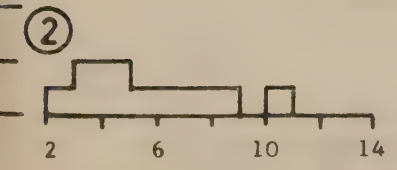


10
3177
(2996)
304
964
30



10
7043
(7474)
963
3046
43

LYMPHOCYTEN

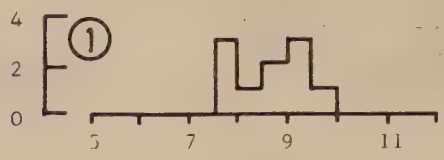


10
5816
(5150)
775
2452
42

ERYTHROCYTEN

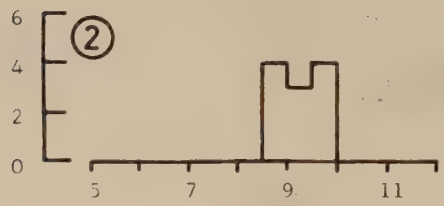
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.

I



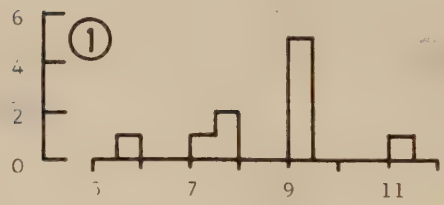
10,00
8,63
(8,64)
0,23
0,72
8

I



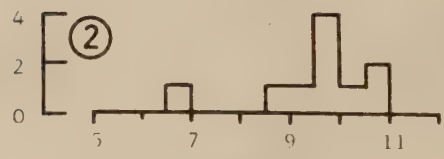
11,00
9,26
(9,46)
0.13
0,45
4

II



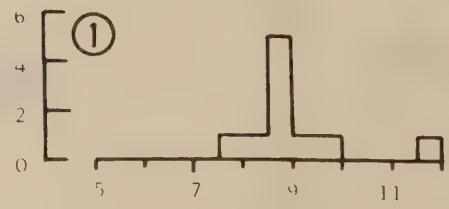
10,00
8,61
(9,07)
0,46
1,45
16

II



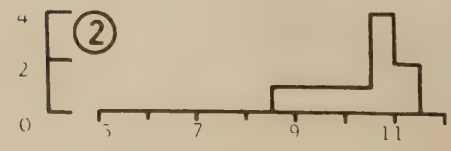
10,00
9,52
(9,79)
0,38
1,22
12

III



10
9,12
(9,84)
0,33
1,05
11

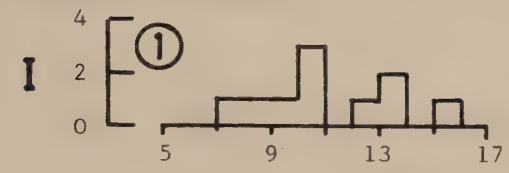
III



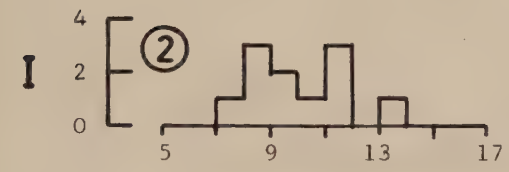
10
10,36
(10,86)
0,25
0,81
7

LEUKOCYTEN

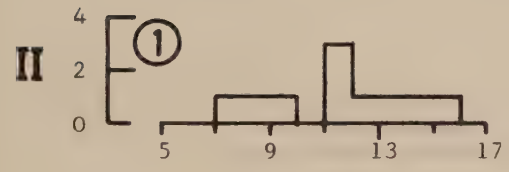
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.



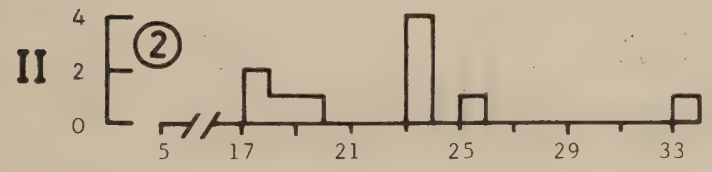
10
11185
(10625)
778
2463
22



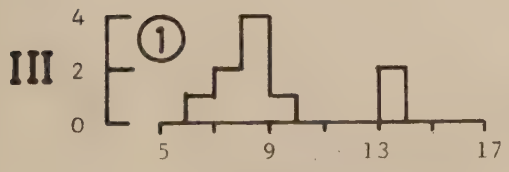
11
9859
(9450)
578
1917
19



10
11530
(11475)
770
2436
21



10
22575
(23450)
1258
48333
21

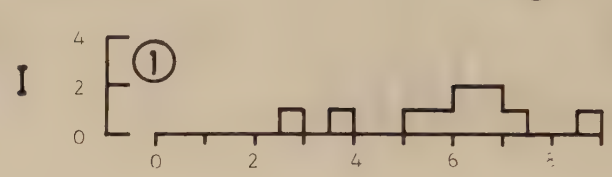


10
9135
(8550)
738
2334
25

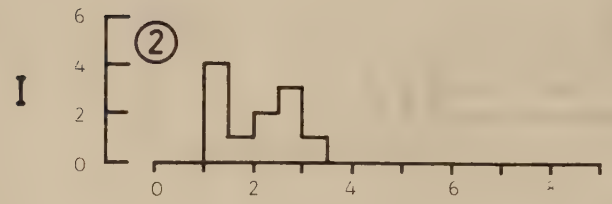
10
19115
(20200)
1459
4614
24

GRANULOCYTEN

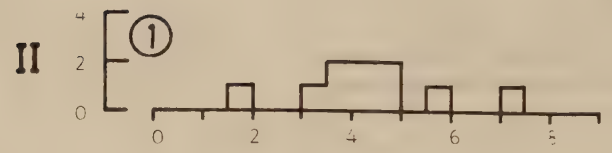
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.



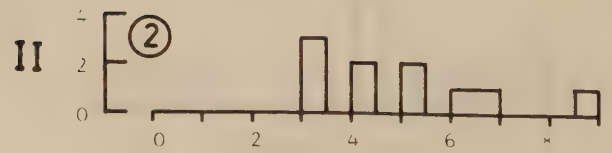
10
5952
(6088)
528
1672
28



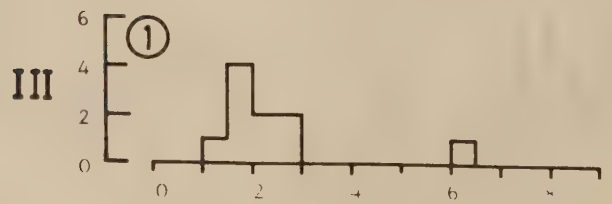
11
2033
(2296)
217
719
35



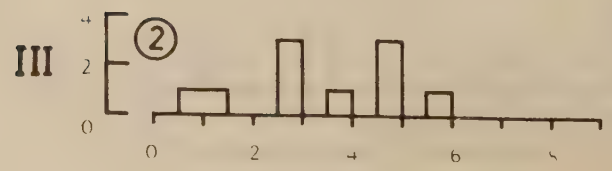
10
4364
(4386)
458
1450
33



10
5014
(4685)
573
1812
36



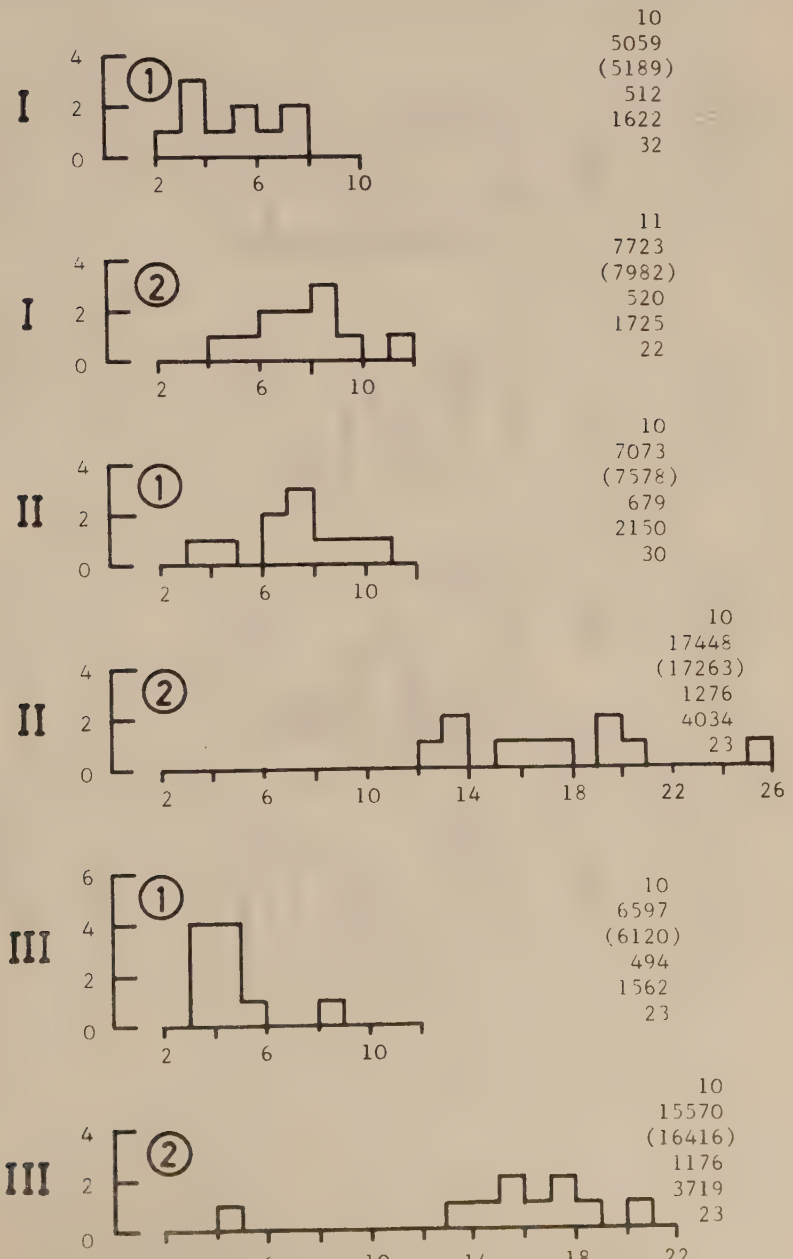
10
2445
(2015)
443
1403
57



10
3431
(3290)
517
1635
47

LYMPHOCYTEN

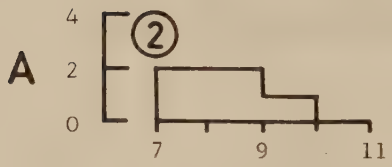
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.



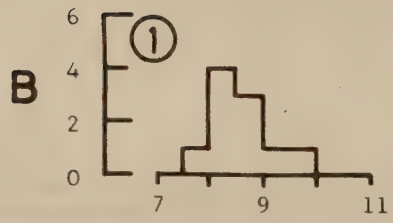
ERYTHROCYTEN

① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.

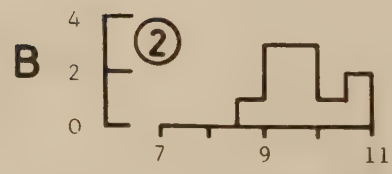
10,00
9,40
(9,60)
0,22
0,71
7



10,00
8,18
(8,18)
0,25
0,79
9



10,00
9,51
(9,46)
0,17
0,55
5

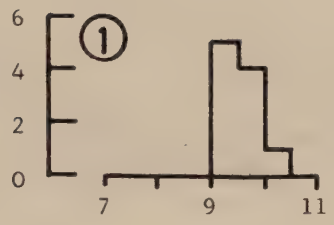


10,00
9,81
(9,75)
0,20
0,65
6

ERYTHROCYTEN

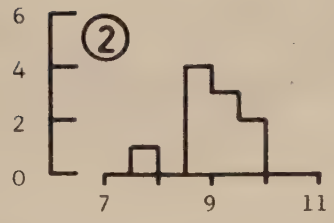
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.

C



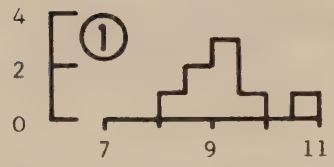
10,00
9,49
(9,50)
0,09
0,30
3

C



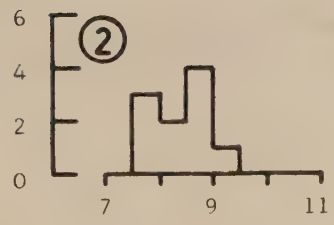
10,00
9,01
(9,03)
0,23
0,72
8

D



8,00
9,26
(9,21)
0,23
0,65
5

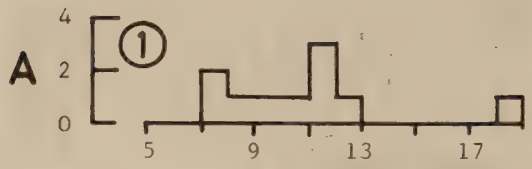
D



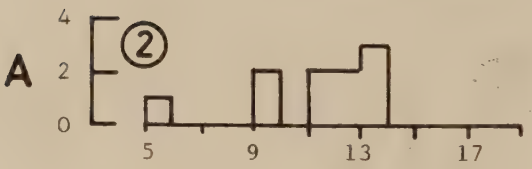
10,00
8,38
(8,54)
0,16
0,53
6

LEUKOCYTEN

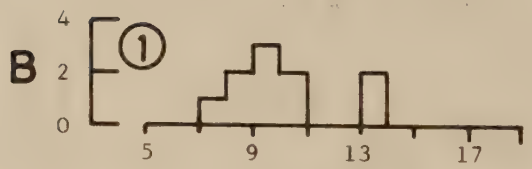
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.



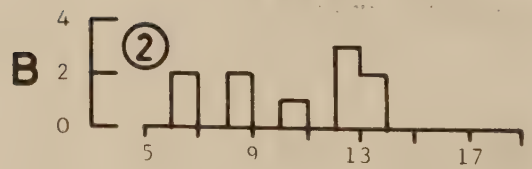
10
10890
(10875)
1017
3217
29



10
11285
(11900)
806
2550
22



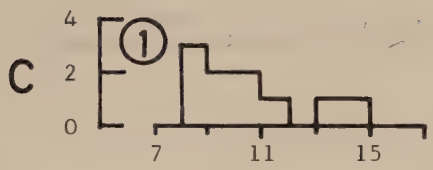
10
10850
(9450)
646
2043
20



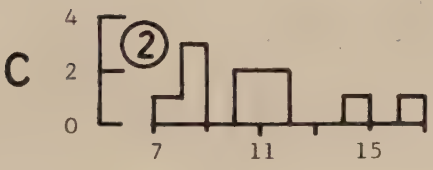
10
10540
(11225)
863
2730
26

LEUKOCYTEN

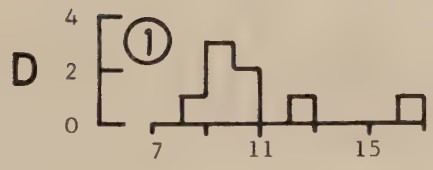
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.



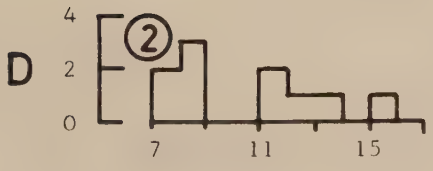
10
10530
(10000)
667
2110
20



10
10865
(10675)
945
2990
27



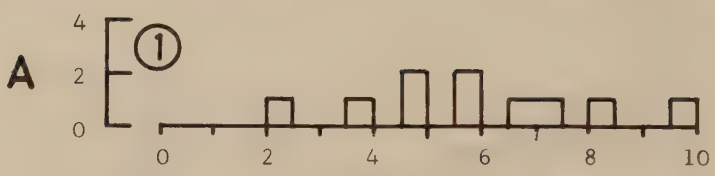
8
10793
(9825)
909
2572
23



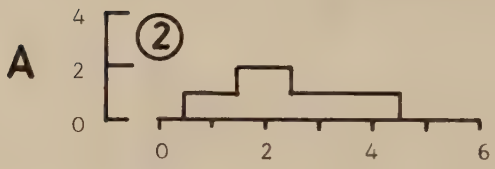
10
10400
(9900)
892
2823
27

GRANULOCYTEN

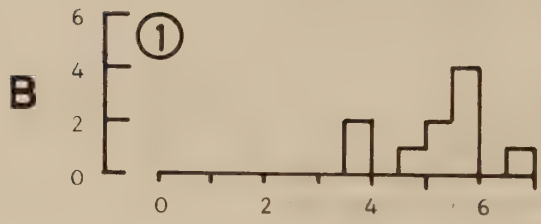
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.



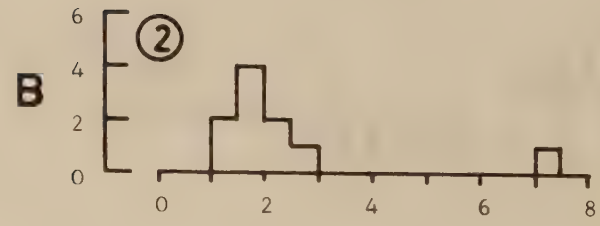
10
5862
(5580)
670
2119
36



10
2382
(2297)
310
982
41



10
5257
(5638)
305
964
18

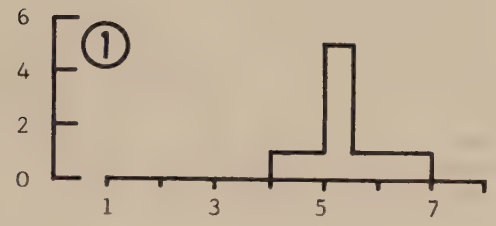


10
2450
(1837)
551
1745
71

GRANULOCYTEN

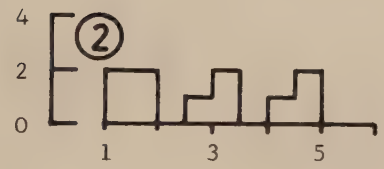
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.

C



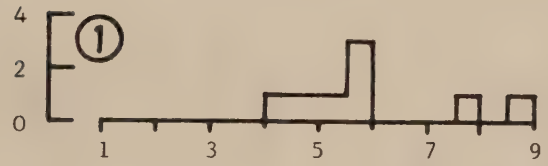
10
5415
(5358)
233
738
13

C



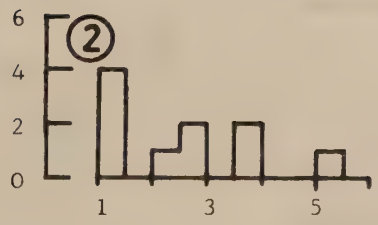
10
2911
(3014)
424
1341
46

D



8
6014
(5746)
547
1549
25

D

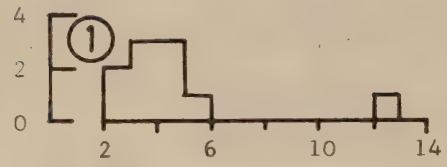


10
2570
(2371)
449
1421
55

LYMPHOCYTEN

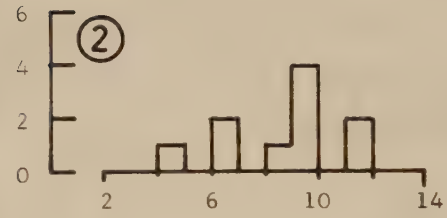
① 8 Std. p.i. ② 24 Std.p.i.

A



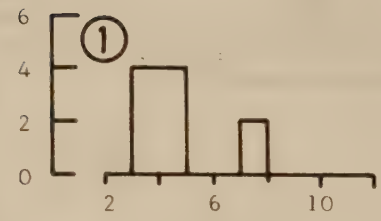
10
4841
(4218)
909
2877
59

A



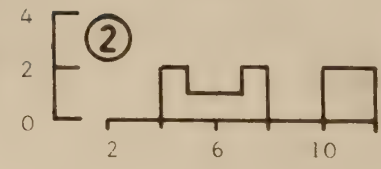
10
8793
(9347)
659
2083
23

B



10
4700
(4328)
498
1575
33

B

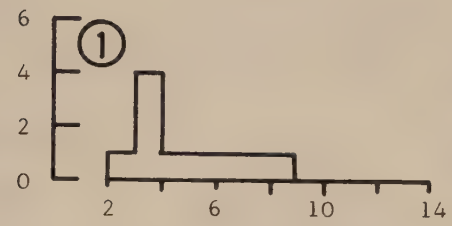


10
7969
(7113)
843
2667
33

LYMPHOCYTEN

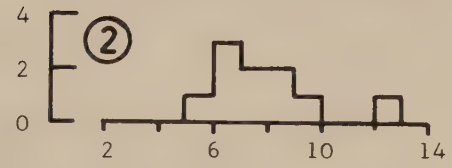
① 8 Std. p.i. ② 24 Std. p.i.

C



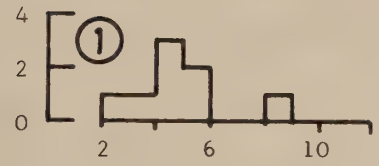
10
5017
(4194)
617
1953
39

C



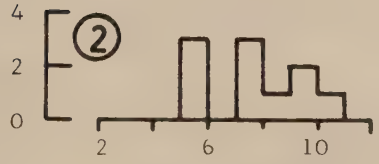
10
7888
(7294)
641
2027
25

D



8
4767
(4653)
662
1872
39

D

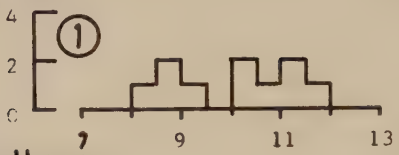


10
7764
(7265)
633
2002
25

C 58/J

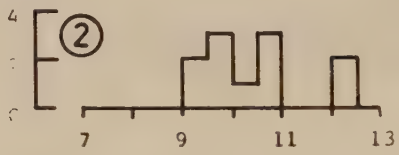
ERYTHROCYTEN

① Mex ② NaCl

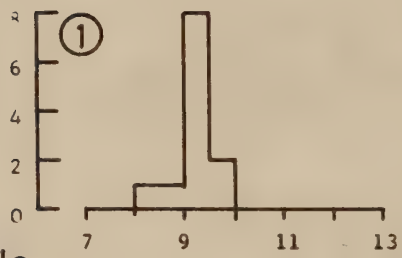


10,00
10,12
(10,25)
0,36
1,15
11

vor Behandlung

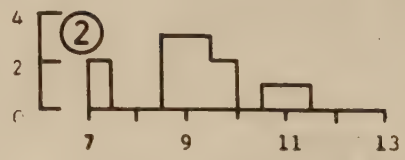


11,00
10,43
(10,22)
0,31
1,03
9

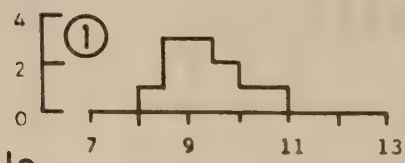


12,00
9,18
(9,14)
0,12
0,42
4

1. Kontrolle

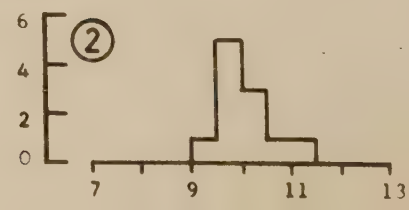


12,00
9,18
(9,23)
0,30
1,06
11



11,00
9,35
(9,35)
0,24
0,80
8

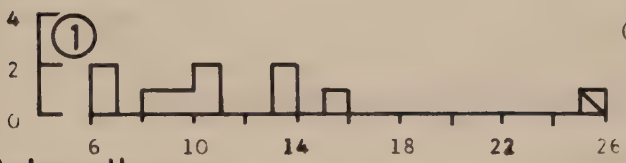
2.Kontrolle



11,00
10,01
(9,97)
0.16
0,56
5

C 58/J LEUKOCYTEN

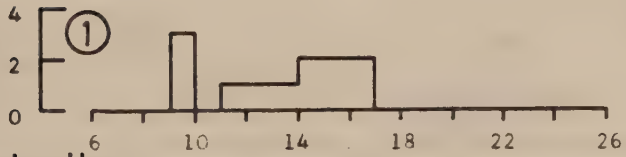
① Mex ② NaCl



10 9
12155 10267
(10750) (10600)
1842 1152
5862 3456
47 32

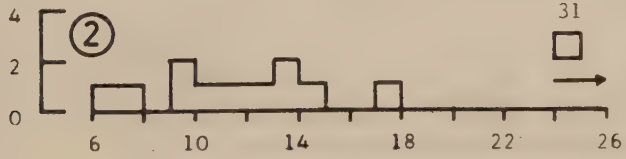
vor Behandlung

11
14931
(15500)
1232
4084
27

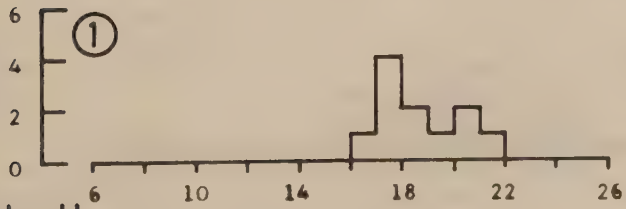


12
13116
(13250)
824
2885
21

1. Kontrolle

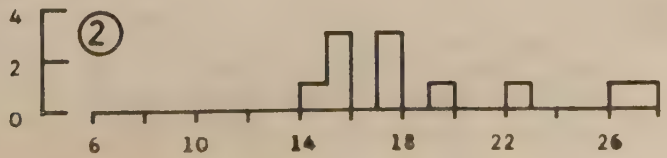


12
13179
(11825)
1907
6609
50



11
18618
(18450)
501
1662
8

2.Kontrolle

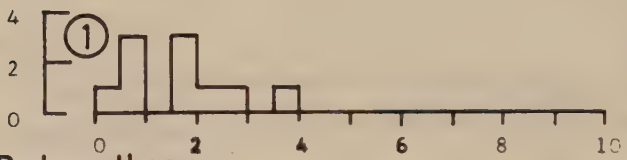


11
18945
(17700)
1369
4542
24

C 58/J

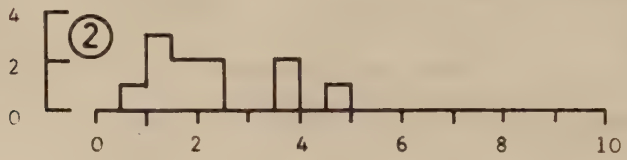
GRANULOCYTEN

① Mex ② NaCl



10
1649
(1812)
356
1218
68

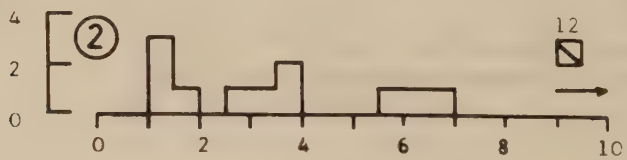
vor Behandlung



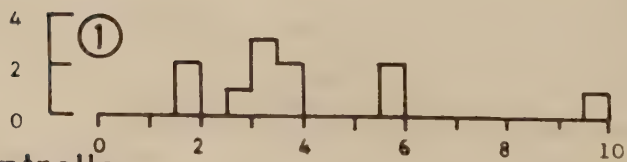
11
2253
(1746)
380
1261
56

12
2764
(2834)
263
912
33

1. Kontrolle



12
4233
(3533)
921
3191
[illegible]



11
3985
(3321)
695
2315
58

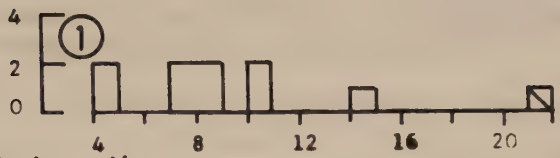
2. Kontrolle

11
4189
(3512)
649
2155
51

C 58/J

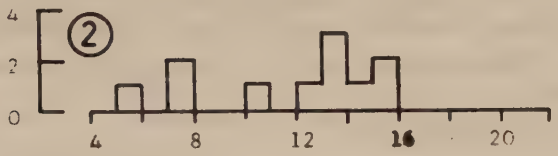
LYMPHOCYTEN

① Mex ② NaCl

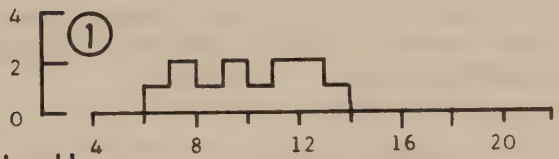


10
9756
(8318)
1648
4897
50

vor Behandlung

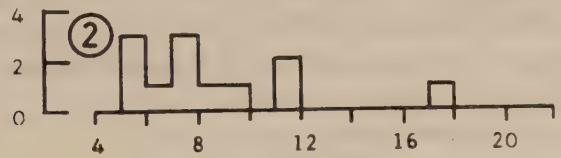


11
11759
(13172)
1059
3513
29

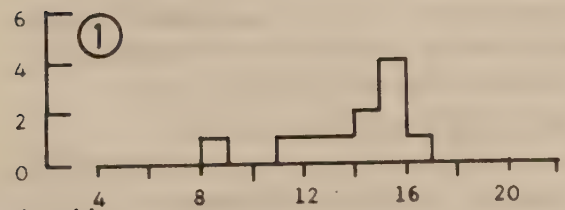


12
10092
(10026)
662
2293
22

1. Kontrolle

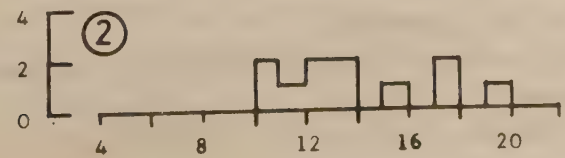


12
8651
(7213)
1040
3602
41



11
13883
(14490)
730
2423
17

2. Kontrolle



11
13915
(13061)
959
3181
22

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1)v.ALBERT,H.-H.:
Hemmwirkung eines Extraktes aus einer menschlichen Hyperspleniemilz in der Knochenmarkkultur
Klin.Wschr. 40 (1962) 211

2)v.ALBERT,H.-H.:
Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung "hypersplener" Milzen I. Experimentelle Untersuchungen mit der Deckglaskulturmethode
Blut 9 (1963) 405

3)v.ALBERT,H.-H.:
Die Wirkung von eiweißfreien Milzextrakten auf die Tetrahydrofolat-Formylase im menschlichen Leukocyten
Klin.Wschr. 43 (1965) 751

4)v.ALBERT,H.-H. und H.ZICKGRAF:
Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung "hypersplener" Milzen II. Experimentelle Untersuchungen an der Flüssigkeitskultur
Blut 12 (1966) 104

5)v.ALBERT,H.-H.:
Biochemische Untersuchungen über knochenmarkwirksame Faktoren in Milzextrakten
Zschr.Inn.Med. 24 (1969) 532

6)ALLEN,B.R., H.G.WARDELL and M.CLAY:
Postirradiation Protection of Rabbits by Injection of "Splenic" Plasma
Science 123 (1965) 1080

7)ARAKI,F. and Y.SUGIHARA:
Carcinostatic Substance Prepared from Bovine Spleen
Hiroshima J.of Med. Sci, 15 (1969) 253

8) BANTI,G.
zitiert nach HITTMAIR,S.58

9) BERENBLUM,J., G.CIVIDALLI, M.E.HODES and N.TRAININ:
A Factor ("RLP") from Sheep Spleen which Inhibits Radiation Leukaemogenesis in Mice
Nature 202 (1964) 973

10) BERENBLUM,J., G.CIVIDALLI, N.TRAININ and M.E.HODES:
Some Properties of "RLP" - A Factor from Sheep Spleen Capable of Inhibiting Radiation Leukaemogenesis in Mice
Blood 26 (1965) 8

11) BIERMAN, H.R.:
Characteristics of Leukopeotin G in Animals and Man
Ann.N.Y.Acad.Sci. 113 (1964) 753

12) BOCK,H.E. und B.FRENZEL:
Splenomegale Knochenmarkkemmung
Klin.Wschr. 17 (1938) 1315

13) COBBIN, L.B. and R.H.THORP:
The Cardioactive Principle in Spleen
Brit.J.Pharmacol. 14 (1959) 392

14) COOPER,K.E.:
in: Pyrogens and Fever
Ciba Foundation Symposium, Churchill Livingstone, London 1971, p.5

15) COTTIER,H.:
Experimenteller Beitrag zur Frage der hypersplenischen Panhämocytopenien
Acta.Haemat.(Basel) 7 (1952) 303

16) CROSBY, W.:
Is Hypersplenism a Dead Issue?
Blood 20 (1962) 94

17) CROSBY ,W, and F,Ruiz:
Evidence of a Myeloinhibitory Factor in the Spleen
Blood 20 (1962) 793

18) DALTON and SELYE:
zitiert nach SCHILLING
Fol.haemat. (Lpz) 62 (1939) 397

19) DAMESHEK,W.:
Hypersplenism
Bull.of the N.Y.Acad.Med. 31 (1955) 113

20) DIETRICH,P., W.RINDT und E.KAISER:
Die Rolle der Milz im endokrinen Gesdhehen, VIII.Mitteilung: Der Einflu3 von Milzwirkstoffen auf die Konjugation von Hydrocortison-4-C^{14}
Acta hepato-splenol. 12 (1965) 293

21) DOUGHERTY,T,F. and J.A.FRANK:
The Quantitative and Qualitative Responses of Blood Lymphocytes to Stress Stimuli
J.Lab.Clin.Med. 42 (1953) 530

22) DOUGHERTY.T.F., M.L.BERLINER, G.L.SCHNEEBELLI:
Hormonal Control of Lymphatic Structure and Function
Ann.NY.Acad.Sci. 113 (1864) 825

23) ELLINGER,F. and Th.A.STRIKE:
Effects of Cell-free Spleen Extract Treatment on Hematopoeitic Tissues of Irradiated Guines-Pigs
Acta Haemat, (Basel) 26 (1961) 117 , 325

24) ERNSTRÖM,U. and G.SANDBERG:
Influence of Splenectomie on Thymic Release of Lymphocytes into the Blood
Scand.J,Haemat. 7 (1970) 342

25) FERRATA,A. and A.FIESCHI:
Risultati e insegnamenti della splenectomia nelle mielosi aplastiche
Hämatologica 23 (1941) 979

26) FISCHER,J.:
Hypersplenismus. Was er ist, was er nicht ist.
Internist 12 (1971) 176

27) FORD, L.C., D.M. DONALDSON and L. ALLEN:
Protection of Mice by Postirradiation Treatment with a Cell-free Component of Spleen
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 127 (1968) 286

28) FRANK, E.:
(Titel fehlt)
Berl. Klin. Wschr. 53 (1916) 555

29) GERLICH, N.:
Darstellung und biologische Eigenschaften von Milzfaktoren mit Wirkung auf Leukämie und Leukopenie
Proc. 6th Congr. Europ. Soc. Haemat. Copenhagen 1957, p. 280

30) GORDON, A.S., E.S. HANDLER, C.D. SIEGEL, B.S. DORNFEST, J. LOBUE:
Plasma Factors Influencing Leukocyte Release in Rats
Ann. N.Y, Acad. Sci. 113 (1964) 766

31) GOSTOMZYK, J.G., C. FEESER und G. RUHENSTROTH-BAUER:
Humorale Stimulierung der Ausschwemmung von Granulocyten aus dem Knochenmark durch die Milz
Klin. Wschr. 42 (1964) 231

32) GOSTOMZYK, J.G., C. FEESER und G. RUHENSTROTH-BAUER:
Zur Chemie und Biologie des Milzfaktors Granulomovin
Z. Naturforschung 19b (1964) 769

33) HARLOW and SELYE:
(zitiert nach SCHILLING)
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 36 (1937) 141

34) HARRIS, P.F., V. MENKIN, J.M. YOFFEY:
The Action of Leukocytosis-Promoting Factor on the Blood and Bone Marrow of the Guinea Pig
Blood 11 (1956(243

35) HAUSS, W.H., G. SCHMITT, U.St. MÜLLER und P. TILLMANN:
Über die gleichförmige Reaktion des hämopoetischen Systems auf heterogene Reize
Med. Welt 22 (1971) 627

36) HEILMEYER, L.:
Funktionsprüfung der Leukopoese des Knochenmarks
Handbuch der gesamten Hämatologie II. Band, S. 332, Verlag Urban & Schwarzenberg, München 1960

37) HITTMAIR, A.:
Physiologie und Pathologie der Milz
Urban & Schwarzenberg, München 1969

38) ISAAC, S.:
(zitiert nach 46)

39) JAEGER, Kh., H. MITTENZWEI:
Die Erzeugung einer Splenomegalie bei Kälbern
Klin. Wschr. 36 (1958) 441

40) JAEGER, Kh. und H. MITTENZWEI:
Deutsches Bundespatent Nr. 1017744 (1958)

41) JYVÄSJÄRVI, S., S. KEINÄNEN, O. RUUSKANEN:
Leukocytosis in the Mouse Induced by Serial Blood Sampling from the Tail
Nature 230 (1971) 122

42) KAISER, E., W. RINDT, W. ZIMMERMANN:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen, I. Mitteilung: Hypophysen-Nebennierenrinden-Funktionskreis unter dem Einfluß eines Milzextraktes
Acta hepato-splenol. 11 (1964) 321

43) KAISER, E. und W. RINDT:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen, II. Mitteilung: Plasma-Cortocosteroidbestimmung beim Meerschweinchen nach Applikation eines selbst hergestellten Milzextraktes
Klin. Wschr. 42 (1964) 646

44) KAISER, E. und W. RINDT:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen, V. Mitteilung: Beziehungen zwischen reticulo-endothelialem System und Steroidmetabolismus im Tierversuch
Dt. med. Forschung 2 (1964) 163

45) KAISER, E. und W. RINDT:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen, IX. Mitteilung: In-vitro-Konjugation von Hydrocortison unter der Wirkung von Milzextrakt
Mat. med. Nordm. 17 (1965) 543

46) KAISER, E. und W. RINDT:
Milz und Endokrinium
Med. Klinik 60 (1965) 985

47) KOMIYA, E.:
Neurohumorale Regulation des Blutes
Proc. 5th Congr. Europ. Soc. Haemat.
Freiburg 1955, p. 179

48) KOMIYA, E.
Ursachen der Zellverschiebungen der Leukocyten
Handbuch der gesamten Hämatologie II. Band
Verlag Urban & Schwarzenberg, München 1962, S. 313

49) KORBITZ, B.C., C.W. REIQUAM and H.D. PALMER:
Splenic Myelosuppressive Syndrom. Case Report
Cancer 22 (1968) 1185

50) McFARLAND, W., N. GRANSVILLE, R. SCHWARTZ, H. OLINER, D.K. MISRA and W. DAMESHEK:
Therapy of hypoplasitc Anaemias with Bone Marrow Transplantation
Arch. int. Med. 108 (1961) 23

51) MOESCHLIN, S.:
Die Leukocytenkurve nach Pyrifer als Knochenmarkfunktionsprüfung
Helvet. med. acta. 12 (1945) 229

52) NEUMAYR, W.:
persönliche Mitteilung

53) OLITZKI, A.L.:
(Titel fehlt)
Path. microbiol 28 (1965) 704

54) PALMER, J.G., E. EICHWALD, G.E. CARTWRIGHT and M.M. WINTROBE:
The Experimental Production of Splenomegaly, Anaemia and Leukopenia in Albino Rats
Blood 8 (1953) 72

55) PENKERT, I.:
persönliche Mitteilung

56) PRIBILLA, W.:
Über einige Funktionen der Milz
Internist 8 (1967) 345

57) RADIOU, N, F.A. ZYDECK and P.L. WOLF:
Inhibition of Adrenal Cortical Hormones by an Extract of Lymphoid Tissue
Experientia 25 (1969) 643

58) REIN, H.:
Die Beeinflussung von Coronar- oder Hypoxie-bedingten Myokard-Insuffizienzen durch Milz und Leber
Pflügers Archiv 253 (1951) 435

59) RIGLER, R. und W. ROSENKRANZ:
Untersuchungen über einen humoral vermittelten, steuernden Einfluß der Milz auf mesenchymale Zellteilungsvorgänge, nachgewiesen am Deziduom der Ratte
Wien. klin. Wschr. 25 (1957) 445

60) RINDT, W. und E. KAISER:
Beziehungen zwischen Milz und Nebennieren-steroiden
Mat. med. Nordm. 16 (1964) 499

61) RINDT,W., E.KAISER.und W.ZIMMERMANN:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen
III.Mitteilung: Harn- und Plasmasteroide
nach Splenektomie im Tierversuch
Acta hepato-splenol. 12 (1965) 98

62) RINDT,W.,E.KAISER und W.ZIMMERMANN:
Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen ,
IV.Mitteilung: Wirkung von Splenektomie auf
Plasmasteroide und Blutbild des Meerschweinchens unter dem Einflu3 eines pyrogenen
Reizstoffes
Endokrinologie 47 (1964) 3

63) ROSENKRANZ,W.:
Zierexperimentelle Untersuchung der Beziehung zwischen Milz und wei3em Blutbild
Proc.7th Congr.Europ.Soc.Haemat. Wien 1961,p.49

64) SACHS,L.:
Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag 1972, 3.Auflage

65) SCHILLING,V.:
Die Regulierung des morphologischen Blutbildes
Proc.5th Congr.Europ.Soc.Haemat.
Freiburg 1955, p. 196

66) SCHLIEPHAKE,E.:
Inkretorisches System und Krankheitsentstehung
Dt.Med.Wschr. 76 (1951) 1325

67) SPEIRS,R.S. and M.E.DREISBACH:
Quantitative Studies of the Cellular Responses to Antigen Injection in Normal Mice
Blood 11 (1956) 44

68) STREICHER,H.J.:
Experimentelle Splenektomie in ihrer Wirkung
auf Erythrocyten-Regeneration, Leukocyten-Regulation und Blutungsschock
Langenbecks Arch klin.Chir. 293 (1960) 245

69) TARNUZI, A. and R.K. SMILEY:
Hematologic Effect of Splenic Implants
Blood 29 (1967) 373

70) THORP, R.H.:
A Cardiac Stimulant Functioning by Calcium Transport
Proc. 4th Int.Congr. Pharmacology, Basel 1969 p.133

71) TOMODA, M.:
TheSplenotoxin and Splenopathic Toxicosis
Kyushu Memoirs of Med. Sci 1 (1950) 39

72) TÜNNERHOFF, F.K. und H.K. SCHWABE:
Tierexperimentelle Untersuchungen über die Möglichkeit, durch Milzextrakt die Entwicklung von Granulationsgewebe zu beeinflussen
Arzneimittelforschung 8 (1958) 773

73) UNGAR, G.:
Endocrine Function of the Spleen and its Participation in the Pituitary-Adrenal Response to Stress
Endocrinology 37 (1945) 329

74) WEINREICH, J.:
Milz und Leber in ihrem Einflu3 auf das Blutbild - Untersuchungsergebnisse zum Problem des "Hypersplenismus"
Acta hepato-splenol. 10 (1963) 82

75) WESTPHAL, O., O.LÜDERITZ und W.KEIDELING:
Über die Wirkungsweise bakterieller Reizstoffe
Zbl. Bakt. 158 (1952) 152

76) WETHERLEY-MEIN, G., N.F.JONES and J.M.PULLAN:
Effects of Splenectomie on Red-Cell Production in Myelofibrosis
Brit, Med.J. 1 (1961) 84

77) WHITE, A., Th. F. DOUGHERTY:
Effects of Prolonged Stimulation of the Adrenal Cortex and of Adrenalectomy on the numbers of circulating Erythrocytes and Lymphocytes
Endocrinology 36 (1945) 16

78) Wissenschaftliche Tabellen Documenta Geigy
7. Auflage 1968

79) WOLF, H.J. und N. GERLICH:
Behandlung von Leukämien mit Milzextrakten
Verh. dt. Ges. Inn. Med. 61 (1955) 266

80) WOLF, H.J. und N. GERLICH:
Der Einfluß normaler Milzextrakte auf das weiße Blutbild
Verh. dt. Ges. Inn. Med. 62 (1956) 530

81) WRIGHT, S.:
Applied Physiology
Oxford University Press, London 1966
11 th Edition

H. LEBENSLAUF

Am 21.10.46 wurde ich als zweites Kind des Physikers Dr.Heinrich Rindfleisch und seiner Frau Rotraut, geb, Wedde, in Göttingen geboren. Nach der Volksschule besuchte ich das Neue Gymnasium in Göttingen und studierte vom Sommersemester 1966 an Humanmedizin an der Göttinger Universität. Im Frühjahr 1967 wurde ich als Stipendiatin in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen. Im Wintersemester 1968/69 studierte ich in Wien, anschließend wieder in Göttingen und ab Winter 1969/70 in München.
Vom Mai bis Oktober 1971 hatte ich eine Doktorandenstelle im Institut für Hämatologie der GSF inne. Nach dem Staatsexamen im Dezember 1971 arbeitete ich als Medizinalassistentin in der I.Medizinischen Universitäts-Klinik in der Abteilung für Hämatologie. Seit August 1972 bin ich als Mitarbeiterin von Herrn Dr.med.Kh.R.Koczorek in der I.Medizinischen Universitäts-Klinik tätig.